# THÈSES

présentées à

LA FACULTÉ DES SCIENCES DE PARIS

pour l'obtention du titre

de DOCTEUR de l'UNIVERSITÉ

de PARIS

(mention Sciences)

**par Monsieur G. E. LUKA ISKANDER**

Sujet de la 1re Thèse :

## Recherches sur le virus de l'anémie infectieuse des Equidés obtenu en cultures de leucocytes

Sujet de la 2e Thèse :

## Le virus de l'encéphalomyélite animale du Proche-Orient Ses rapports avec le virus de la maladie de Borna

Soutenues le 25 JUIN 1969 devant la Commission

composée de : Président : Monsieur André LWOFF.

Examinateurs : Monsieur Jean-Marie DUBERT,

Monsieur Pierre GORET.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552226_0010

# THÈSES

présentées à

LA FACULTÉ DES SCIENCES DE PARIS

pour l'obtention du titre

de DOCTEUR de l'UNIVERSITÉ

de PARIS

(mention Sciences)

**par Monsieur G. E. LUKA ISKANDER**

Sujet de la 1re Thèse :

**Recherches sur le virus de l'anémie infectieuse des Equidés obtenu en cultures de leucocytes**

Sujet de la 2e Thèse :

**Le virus de l'encéphalomyélite animale du Proche-Orient Ses rapports avec le virus de la maladie de Borna**

Soutenues le 1969 devant la Commission composée de :

Président : Monsieur André LWOFF.

Examinateurs : Monsieur Jean-Marie DUBERT,
Monsieur Pierre GORET.

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

A MON PERE ET A MA MERE

Qu'ils voient dans ce travail la preuve de mon affection filiale et de ma reconnaissance.

A MA FEMME

Pour son aide et ses encouragements au cours de mes études.

A MES ENFANTS

A MES BEAUX - PARENTS

A MES FRERES ET SOEURS

A L'INSTITUT DES SERUMS ET VACCINS

ABBASIYA . LE CAIRE

EGYPTE

Nous exprimons notre très profond respect et toute notre gratitude au Docteur André LWOFF, Professeur à la Faculté des Sciences de Paris, prix Nobel de Médecine, qui nous fait le grand honneur d'accepter la présidence de notre jury de thèse.

---

Nous sommes très reconnaissant à Monsieur le Professeur Jean-Marie DUBERT, Professeur à la Faculté des Sciences de Paris, d'avoir bien voulu accepter de faire partie du jury de notre thèse.

Nous exprimons également notre très profond respect et toute notre gratitude à Monsieur le Professeur Pierre GORET, Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, qui nous a accueilli dans son service.

Il nous a proposé le sujet de cette thèse, nous a guidé dans son élaboration et nous a fait l'honneur de siéger à notre jury.

Nous lui serons toujours reconnaissant de nous avoir aidé dans notre carrière.

Il ne nous aurait pas été possible de réaliser ce travail sans Docteur Bernard TOMA, chef de travaux à l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort.

Qu'il nous soit permis de lui exprimer notre toute particulière titude pour son aide généreuse de tous les instants, l'amicale attention dont a su faire preuve à notre égard et tout ce qu'il a fait pour nous.

Ces mots sont insuffisants pour traduire tous nos sentiments.

---

Nous exprimons à Monsieur le Docteur W. BERNHARD, Chef du Laboraire du service de microscopie électronique à l'Institut Gustave Roussy notre titude pour son accueil bienveillant et son aide généreuse et précieuse.

---

Notre reconnaissance va également à Madame le Docteur MORAILLON laboratoire de l'INRA de la chaire de Pathologie Médicale des équidés et à sieur le Docteur FAVE, Ingénieur principal de l'INRA à l'Ecole Vétérinaire d'Alrt pour l'aide précieuse qu'ils nous ont apportée.

Nous présentons nos remerciements à Monsieur le Docteur J. MAURIN Chef du laboratoire au service des virus de l'Institut Pasteur de Paris et au Vétérinaire Commandant POUSSOT du laboratoire militaire de l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort pour leur aide et leurs conseils.

---

Nous sommes heureux de remercier toutes les personnes du Service des Maladies Contagieuses de l'Ecole Vétérinaire d'Alfort, tout spécialement Madame BRAYER, Mademoiselle DOULET et Mademoiselle JONCRET.

---

Notre reconnaissance est acquise :

- Au Ministère des Affaires Etrangères de France (ASTEF) ;
- à la Faculté des Sciences de Paris ;
- Au Ministère de l'Agriculture : qui a accepté que je travaille à l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort ;
- à Monsieur le Professeur CHARTON, Directeur de l'Ecole Vétérinaire d'Alfort pour son accueil bienveillant ;
- à la Société d'Encouragement pour l'amélioration des races de chevaux en France.

" I think, probably the virus of equine infectious anemia is one of the most interesting, intriguing, enticing, exciting and heart-breaking, I've ever worked with".

SAURINO.

# Introduction

L'anémie infectieuse des équidés est apparemment une maladie en voie de disparition en France. En effet, le nombre de foyers observés chaque année au cours des trois dernières decennies a diminué progressivement pour s'annuler finalement en 1968.

Et cependant l'importance de cette maladie est loin d'être négligeable. D'abord parce qu'elle a "changé de visage" recemment et qu'elle sévit non plus sur des chevaux de trait comme autrefois, mais sur des animaux de course ou de sport dont la valeur, pour certains sujets, peut se chiffrer par dizaines de millions. Ensuite, parce que l'on peut penser que cette disparition n'est qu'apparente et provisoire lorsque l'on connait les surprises que réserve un tel virus.

Au surplus, cette maladie présente un remarquable interêt dans le cadre de la pathologie comparée.

Au cours de ces dernières années, plusieurs foyers d'anémie infectieuse ont été identifiés au Laboratoire du Service des Maladies Contagieuses de l'Ecole d'Alfort et différentes souches ont été isolées. Cette maladie a été l'objet d'un programme de recherches financé par la "Société d'Encouragement pour l'amélioration des races de chevaux en France" et portant sur l'étude de modalités nouvelles du diagnostic de l'infection.

Dans le cadre de ce programme de recherches, le Professeur GORET nous a confié, sous la direction de son collaborateur le Docteur Vétérinaire TOMA, Chef de Travaux, la partie concernant l'étude du virus de l'anémie infectieuse en culture cellulaire, et plus particulièrement en culture de leucocytes de cheval. Ce travail rentre donc dans le cadre d'un travail d'équipe à laquelle nous avons été fort heureusement pour nous intégré.

Comme nous le verrons plus loin, ce virus est encore à l'heure actuelle l'un des plus mal connus. La nature de son acide nucléique, son type de symétrie, sa structure pour ne citer que des élements essentiels restent (ou restaient) inconnus. Un tel sujet d'étude offre donc un champ d'investigation extrêmement large... mais aussi assez délicat en raison des difficultés que l'on éprouve pour caractériser la présence du virus , hormis l'inoculation au cheval.

Enfin, la pathogénie encore fort obscure de cette anémie d'origine virale, unique en pathologie comparée, et de la prolifération massive et généralisée d'élements lymphoïdes - à tel point que l'auteur Américain SQUIRE n'hésite pas à la classer parmi les maladies "lymphoprolifératives" à côté de lymphomes, de myélomes, de la maladie Aléoutienne etc... et que les docteurs Japonais YAMAGIWA et ONO emploient même le mot de leucémie - peut inciter à prendre le virus de l'anémie infectieuse comme modèle d'étude des maladies à prolifération cellulaire anormale d'origine virale.

Notre ambition s'est limitée à traiter, dans une première partie des connaissances acquises d'une part sur les cultures de leucocytes dans les différentes espèces animales et humaine, d'autre part sur le virus de l'anémie infectieuse, à exposer dans une seconde partie, les techniques, les résultats et les commentaires qui découlent de nos recherches personnelles sur la culture de leucocytes de cheval et sur leur utilisation à l'étude du virus de l'anémie infectieuse des équidés, selon le plan détaillé ci -après

# PLAN

- Introduction

Première partie : Connaissances acquises en matière de culture de leucocytes. Applicati à l'étude du virus de l'Anémie infectieuse des équidés.

I. Connaissances acquises en matière de culture de leucocytes.

A. Les cultures de leucocytes humains et de diverses espèces animales.

1. Culture de leucocytes humains.

a) Technique classique.

b) Stimulation par la phytohémagglutinine (PHA).

c) Stimulation par sérum antilymphocytaire.

d) Test de transformation lymphoblastique.

2. Culture de leucocytes de porc.

Technique de HESS et DE TRAY

Technique de HAAG et LARENAUDIE

3. Culture de leucocytes bovins

Technique de TOKUDA et coll.

Technique de KONO.

4. Culture de leucocytes de poulet.

B. Etude particulière de la culture des leucocytes de cheval.

1. Modalités de mise en culture.

a) Technique de KOBAYASHI.

b) Technique de WATANABE.

c) Technique de LIVINGSTON et coll.

d) Technique de DESCARPENTRIES.

2. Milieux de culture utilisés.

3. Concentration des leucocytes.

4. Chevaux donneurs de leucocytes

I. Connaissances acquises sur le virus de l'anémie infectieuse des équidés.

A) Propriétés physiques et action des agents physiques.

1) Filtration.

2) Ultracentrifugation.

3) Adsorption.

4) Action de la température.

5) Action des rayons.

B) Morphologie.

C) Propriétés chimiques et action des agents chimiques.

D) Culture du virus.

1) Culture in vivo.

2) Culture in ovo.

3) Culture en culture cellulaire.

a) Effet cytopathogène.

b) Passages en série.

c) Vérification de la replication virale en culture de leucocytes de cheval par inoculation au cheval.

d) Titrage du virus.

e) Interférence avec d'autres virus.

E) Virulence.

F) Pouvoir antigène.

G) Pouvoir immunigène.

H) Pouvoir allergène.

ème partie : Recherches personnelles.

ion : But du travail et ensemble des recherches entreprises.

termination des conditions optimales de culture des leucocytes de cheval.

Introduction.

A. Matériel et techniques.

1) Matériel.

2) Techniques.

a) Mise en culture

b) Milieux utilisés.

c) Concentration leucocytaire.

d) Influence du pH.

e) Stimulation des leucocytes par la phytohémagglutinine et le sérum antilymphocytaire.

f) Essai de trypsination des leucocytes.

g) Culture de leucocytes de cheval au cours d'une crise d'Anémie infectieuse.

h) Appréciation de l'état des leucocytes.

B. Résultats.

a) Mise en culture.

b) Milieux utilisés.

c) Concentration leucocytaire.

d) Influence du pH.

e) Influence du cheval donneur de cellules.

f) Stimulation des leucocytes de cheval en culture par la phytohémagglutinine et le sérum antilymphocytaire.

g) Trypsination des leucocytes.

h) Culture des leucocytes d'un cheval au cours d'une crise d'Anémie infectieuse.

i) Culture à 30°.

C. Discussion.

II. Etude du virus de l'anémie infectieuse inoculé aux cultures de leucocytes de che

A) Matériel.

1) Souches virales.
2) Systèmes cellulaires.
3) Milieux de culture.
4) Produits de laboratoire.
5) Chevaux.
6) Microscope électronique.

B) Techniques.

1) Inoculation des cultures de leucocytes.
2) Emploi d'autres systèmes cellulaires.
   a) Cellules $PK_{15}$
   b) Cellules KB.
   c) Cellules rénales de singe.
   d) Cellules NIL.
3) Titrage du virus en culture de leucocytes.
4) Culture de leucocytes sous couche de gélose.
5) Filtration.
6) Emploi de la 5 iodo 2 desoxyuridine.
7) Emploi de l'acridine orange.
8) Microscopie électronique.

C) Résultats.

1) Rapports antigèniques et immunigèniques entre les souche
çaises et américaine du virus de l'anémie infectieuse.
2) Effet cytopathogène sur les leucocytes de cheval.
   a) Cellules vivantes.
   b) Après coloration.
3) Passages en série sur leucocytes de cheval.
4) Autres systèmes cellulaires.
5) Titrage du virus sur leucocytes de cheval.
6) Culture des leucocytes sous couche de gélose.
7) Filtration.
8) Nature de l'acide nucléique.
   a) Action de la 5 iodo 2 desoxyuridine.
   b) Emploi de l'acridine orange.
9) Etude au microscope électronique.

D) Discussion.

1) Effet cytopathogène sur les leucocytes de cheval.

a) cellules vivantes.

b) Après coloration.

2) Passages en série sur leucocytes de cheval.

3) Autres systèmes cellulaires.

4) Titrage du virus sur leucocytes de cheval.

5) Culture des leucocytes sur couche de gélose.

6) Filtration.

7) Nature de l'acide nucléique.

a) Action de la 5 iodo 2 desoxyuridine.

b) Emploi de l'acridine orange.

8) Pouvoir immunigène du virus de l'anémie infectieuse.

9) Microscope électronique.

# PREMIERE PARTIE

## CONNAISSANCES ACQUISES EN MATIERE DE CULTURE DE LEUCOCYTES

## APPLICATIONS A L'ETUDE DU VIRUS DE L'ANEMIE INFECTIEUSE DES EQUIDES.

# I - CONNAISSANCES ACQUISES EN MATIERE DE CULTURE DE LEUCOCYTES.

L'étude des connaissances acquises en matière de culture leucocytaire sera divisée en deux parties : la première traite des grandes modalités de la culture des leucocytes humains et de quelques espèces animales ; la seconde porte sur une étude particulière de la culture des leucocytes de cheval.

Un dernier chapitre évoque les résultats obtenus par différents auteurs ayant étudié la multiplication du virus de l'anémie infectieuse en culture de leucocytes de cheval.

## A. Les cultures de leucocytes humains et des diverses espèces animales.

### 1°) Culture de leucocytes humains.

C'est pour l'espèce humaine que la culture de leucocytes a été l'objet du plus grand nombre de travaux. En effet, cette technique est employée dans diverses circonstances : essais de production d'interférons humains ; étude des caryotypes de l'homme ; multiplication virale ; recherches d'histocompatibilité, etc...

Il n'est pas nécessaire pour notre étude, d'effectuer un tour complet de la bibliographie concernant les cultures de leucocytes humains. Seules, les très grandes lignes et les principales modalités de culture seront retenues, en particulier celles indiquées par FAUCONNIER ( 27 ). Nous envisagerons ensuite quelques techniques particulières, comme la stimulation par la phytohémagglutinine ou le sérum antilymphocytaire et enfin le test de transformation lymphoblastique.

#### a) Technique classique

Le sang est prélevé aseptiquement avec 30 unités d'héparine par ml et il est distribué dans des tubes stériles de I7 mm en verre neutre (IO ml par tube). Les tubes sont inclinés à 45° et mis à incuber à 37° pendant environ 45 à 60 mn. Après sédimentation des hématies, le plasma surnageant

est recueilli aseptiquement, en évitant de prélever la couche immédiatement en contact avec les hématies ; celle-ci contient surtout des polynucléaires qui dégénèrent rapidement en culture. On effectue alors une numération des cellules blanches à l'hématimètre puis on centrifuge le plasma à 200 tours/mn pendant 5 mn afin d'éliminer le maximum de plaquettes subsistant dans le surnageant. Le culot cellulaire est repris à raison de 3 à 4 millions de cellules par ml dans du plasma débarrassé des plaquettes grâce à une centrifugation à 2800 tours/mn pendant IO mn.

2 volumes du milieu de PARKER I99 contenant 30 unités d'héparine par ml sont ajoutés à un volume de plasma contenant les cellules.

La suspension de leucocytes est alors distribuée dans des tubes à essais de I7 mm en verre neutre à raison de 3 ml par tube ; les tubes sont bouchés au caoutchouc et placés à l'étuve à 37° en position verticale.

Les 2/3 du milieu sont changés tous les deux ou trois jours.

Pour examiner les cultures et l'état des cellules, on décante doucement le liquide à la pipette, on prélève le culot cellulaire et on l'étale rapidement sur une lame avant de le colorer au Giemsa.

Quelques modifications peuvent être apportées à cette technique. On peut, en effet, utiliser du sang non héparini, mais défibriné par agitation.

Il est possible par ailleurs d'accélérer la sédimentation des globules rouges, en ajoutant au sang héparini ou défibriné, I,5 p.I00 de dextran de poids moléculaire 200.000. Le dextran se fixe sur les hématies et les rend plus lourdes. La sédimentation est donc plus rapide et la quantité de leucocytes recueillis est plus importante.

Une autre modalité concerne l'élimination du plasma humain de la culture. On peut en effet, après centrifugation du plasma, laver les leucocytes une ou deux fois à l'aide du milieu de PARKER et les reprendre dans du sérum de veau à la concentration voulue (IO à 30%). La suite des opérations est la même ; cette technique est moins favorable pour la production des lymphocytes mais tout aussi bonne pour celle des histiomonocytes.

La technique de FAUCONNIER ( 27 ), décrite ci-dessus, est réalisée en tubes ronds. On peut envisager l'emploi de flacons ou de tubes à lamelles encore appelés tubes de LEIGHTON. Cette dernière modalité permet, après fixation et coloration de la lamelle, d'observer de façon optimale l'aspect des cellules et un éventuel effet cytopathogène.

Les résultats obtenus grâce à ces différentes techniques sont en général les suivants :

1. Les polynucléaires dégénèrent rapidement et sont éliminés lors des changements de milieu.

2. Les hématies résiduelles subsistent sans modification apparente pendant quelque temps, puis se lysent.

3. Les plaquettes subsistent pendant longtemps.

4. Seuls, les lymphocytes, monocytes et histiomonocytes peuvent être appelés à survivre longtemps et même à se multiplier.

Lors de l'emploi de tubes à lamelles, ce sont essentiellement les monocytes et les histiomonocytes qui se fixent et donnent un véritable tapis cellulaire. Les lymphocytes, au même titre que les polynucléaires, ne se fixent pas sur le verre et sont éliminés en même temps que les hématies éventuellement présentes, lors du changement de milieu.

En résumé, les cellules qui se fixent et qui survivent lors de mise en culture de leucocytes, sont les monocytes et les histiomonocytes.

b) Stimulation par la phytohémagglutinine (PHA)

La phytohémagglutinine est une substance extraite du haricot. Elle a la propriété, d'une part, d'agglutiner les hématies, et, d'autre part, de provoquer la stimulation active des lymphocytes. Les principes responsables de ces deux phénomènes ne sont pas les mêmes. On distingue la phytohémagglutinine M et la phytohémagglutinine P, purifiée, cinquante fois plus active que la précédente et ne renfermant plus de polysaccharide .

Si les autres éléments du sang ne paraissent pas affectés par les stimulants, les lymphocytes, en revanche, changent rapidement d'aspect (en 2 à 4 jours) ; ils deviennent plus gros (cytoplasme et noyau), plus actifs, le cytoplasme devient fortement basophile et dans le noyau apparaissent un ou deux nucléoles. Ils synthétisent protéines, ARN et ADN alors que les lymphocytes non stimulés n'en synthétisent pas. Une division par mitose apparait vers le 4ème jour. Après une ou deux divisions et une vie d'une à deux semaines, ces cellules dégénèrent. Ce sont des cellules d'aspect lymphoblastique.

Pour réaliser la stimulation des lymphocytes par la phytohémagglutinine, il suffit d'ajouter cette substance à raison de 2 p.100, soit une goutte avec la technique de FAUCONNIER (27 ).

Cette stimulation par phytohémagglutinine est surtout intéressante pour l'observation des mitoses des leucocytes et l'appréciation des caractères des chromosomes. NOWELL a employé la phytohémagglutinine dans cette optique ( 80 ). La même technique a été simplifiée et utilisée par MOORHEAD et coll. ( 72 ).

c) Stimulation par sérum antilymphocytaire.

En présence de complément, un sérum antilymphocytaire possède la double propriété d'agglutiner les lymphocytes correspondants et d'entraîner leur lyse. Cette qualité a été mise à profit dans le contrôle des activités des sérums antilymphocytaires pour la réalisation de deux tests qui sont, d'une part, le test de lymphoagglutination, d'autre part, le test de lymphocytotoxicité.

Il a été démontré par plusieurs auteurs, qu'en l'absence de complément, ce même sérum antilymphocytaire était capable d'entraîner une stimulation des lymphocytes et l'apparition de mitoses au même titre que la phytohémagglutinine. Cette propriété a été bien étudiée en particulier par GRASBECK et coll. ( 34 a), par HOLT et coll. ( 42 ), par MOORHEAD et coll. ( 105 ), par FRIES et coll. ( 29 ).

La technique d'étude de la stimulation des lymphocytes par le sérum antilymphocytaire employée par FRIES et coll. ( 29 ) est la suivante :

le sang prélevé sur héparine est filtré sur colonne de nylon à 37°. Au sang filtré, on ajoute un quart de son volume de dextran de poids moléculaire 200.000 en solution à 5 p.100 dans du sérum physiologique. Après sédimentation, le culot est mis en suspension dans du liquide de Hanks puis centrifugé à 1000 tours/mn. Le culot est remis en suspension dans du milieu de culture, constitué par du milieu de Eagle (additionné de 100 unités de pénicilline G par ml et de 100 µg de streptomycine par ml), à raison d'un ml pour 10 ml au départ. La concentration des cellules est ajustée à 700 lymphocytes par mm3 ; la viabilité de ces cellules est vérifiée par le test d'exclusion au bleu trypan, l'échantillon étant éliminé si le pourcentage de cellules mortes excède 5 p. 100. La suspension est alors répartie dans les tubes de culture à raison de 4 ml par tube. On ajoute 1 ml de sérum antilymphocytaire ou de la dilution adéquate dans chaque tube. Le pH est ajusté grâce à un mélange d'air contenant 5 p.100 de $CO_2$ pendant

IO secondes. Les tubes sont soigneusement bouchés et placés à l'étuve à 37°.

Le pourcentage de cellules transformées est déterminé après coloration au May Grünwald Giemsa. L'activité de synthèse du DNA et du RNA est déterminée par incubation avec de la thymidine 3 H et de l'uridine I4 C pendant 24 heures, et comptage de la radio-activité incorporée.

d) Test de transformation lymphoblastique.

HALPERN ( 37 ) a étudié ce test. Il a montré en particulier que lors de mise en culture simultanée de lymphocytes de 2 sujets A et B génétiquement différents, on observe une transformation blastique dans un pourcentage variant de 50 à 75 p. IOO. Si A et B sont jumeaux monozygotes, il n'y a pas de transformation lymphoblastique. Cette transformation est due à l'intervention d'un phénomène immunologique, comme l'a démontré HALPERN par irradiation de l'une des deux populations lymphocytaires mises en culture : lors de culture simultanée lymphocyte et lymphocyte irradié, la transformation ne se produit pas.

2°) Culture de leucocytes de porc.

La culture de leucocytes de porc a été utilisée surtout comme milieu de réplication du virus de la Peste porcine africaine. Plusieurs techniques ont été décrites. Nous en retiendrons celles de HESS et DE TRAY (41 ) et de HAAG et LARENAUDIE ( 36 ) qui ont modifié la précédente.

- Technique de culture de leucocytes de porc selon HESS et DE TRAY. ( 41 )

Le prélèvement de sang est effectué à la veine cave antérieure. Le sang est défibriné par agitation à l'aide d'une baguette dotée d'un mouvement de rotation, Après défibrination, le sang est filtré sur gaze stérile et centrifugé à 2000 tours/mn pendant 30 minutes. On aspire alors le sérum sans toucher aux cellules qui se trouvent dans le culot. Les leucocytes sont rassemblés à la partie supérieure de ce culot et ils sont récupérés à l'aide d'une pipette. Ces cellules sont remises en suspension dans IO ml d'eau physiologique et centrifugées de nouveau afin d'éliminer les hématies qui ont été entrainées.

Les leucocytes sont alors remis en suspension dans le sérum initial. On ajoute IOO U.I. de pénicilline et IOO µg de streptomycine pour chaque ml de suspension. La suspension est répartie dans des tubes stériles à raison de 2 ml par tube. Les tubes sont ensuite bouchés et placés à l'étuve à 37° en position inclinée.

Cinquante à soixante quinze tubes de culture peuvent être ainsi préparés à partir de 200 ml de sang.

Cette technique a donné de bons résultats à HESS et DE TRAY en particulier pour la réaction d'hémadsorption due au virus de la peste porcine africaine. Elle a été modifiée par HAAG et LARENAUDIE de la façon suivante :

- Technique de culture de leucocytes de porc selon HAAG et LARENAUDIE ( 36 ).

Ces auteurs ont utilisé comme donneurs de sang des animaux jeunes pesant entre 25 et 35 kg. Le prélèvement de sang est effectué à la veine cave antérieure. On recueille IO ml de sang dans une seringue contenant

4 mg d'héparine et on assure un bon mélange du sang avec l'héparine en retournant plusieurs fois la seringue. Le sang est ensuite introduit dans un tube à essai de I6 mm muni d'un bouchon de caoutchouc, en évitant la formation de bulles d'air. Ce tube est placé en position inclinée à 45° dans une étuve réglée à une température de 70°.

La sédimentation des hématies est mesurée en notant toutes les cinq à dix minutes la hauteur du plasma au dessus du culot d'hématies. On représente graphiquement la courbe de sédimentation en portant en abscisses le temps et en ordonnées la hauteur de la colonne de plasma. Au début, la sédimentation est très rapide, puis après 30 à 40 mn, en moyenne, la vitesse de sédimentation ralentit nettement, et la courbe s'infléchit pour devenir lentement parallèle à l'axe des abscisses.

Le prélèvement du plasma renfermant les leucocytes est effectué au moment où la courbe commence à s'infléchir. Selon les animaux, ce temps se situe entre 60 et 70 mn après le début de la sédimentation.

Le plasma est alors dilué dans 4 ou 5 volumes de solution de Hanks, puis centrifugé pendant 4 mn à I000 tours/mn. Le surnageant opalescent riche en plaquettes sanguines est éliminé ; le culot cellulaire est dilué dans le milieu de culture composé de liquide de Hanks, hydrolysat de lactalbumine additionné d'extraits de levure, et de 40 p.I00 de sérum de porc. A ce milieu on ajoute de la pénicilline et de la streptomycine. Le pH du milieu est ajusté à 7,2 et la stérilisation assurée par filtration sur filtre Seitz EKS 2.

Après numération, cette suspension est ajustée à la concentration de 2,5 x $10^6$ leucocytes par ml, puis distribuée dans des tubes de I6 mm à raison de 1 ml par tube.

Les flacons de culture sont ensemencés à raison de $10^6$ cellules par cm2 de surface utile. Pour les tubes de Leighton on utilise $10^7$ cellules par tube. Les récipients sont ensuite placés à l'étuve à 37° en position inclinée. Il est nécessaire de changer le milieu d'abord au bout de 3 jours, puis tous les 5 jours.

Cette technique dérivée de celle de TUBIASH ( 97 ) a donné d'excellents résultats à HAAG et LARENAUDIE pour la culture du virus de la Peste Porcine Africaine.

Ces auteurs ont insisté sur les points suivants :

il est préférable de s'adresser à des animaux jeunes car leur sang est plus riche en leucocytes.

L'inclinaison des tubes à 45° accélère la sédimentation et augmente le rendement de la méthode.

D'autre part, la représentation graphique de la sédimentation est nécessaire en raison de la variabilité de cette vitesse selon les prélèvements de sang. Si on tarde en effet à recueillir la suspension, on obtient sous un volume un peu plus grand une suspension moins riche en leucocytes.

Tels sont les principaux éléments de la technique de HAAG et LARENAUDIE dont nous avons mis plusieurs à profit pour mener à bien une technique personnelle.

3°) Culture de leucocytes bovins.

Dès 1958, DUNNE et coll. ( 25 ) ont obtenu d'excellents résultats avec les leucocytes bovins. La culture de leucocytes bovins a ensuite été l'objet de travaux de TOKUDA et coll. ( 94 ) et de PIGOURY et coll. (82 ) afin d'étudier le virus de la peste bovine, puis de KONO ( 55 ) en vue de la production d'interféron.

DUNNE et coll. ont obtenu un étalement des cellules sur la surface du verre avec augmentation de la taille des cellules et division des noyaux. En quelques jours apparaissent des cellules géantes ou des syncytiums contenant de très nombreux noyaux.

- Technique de culture de leucocytes bovins selon TOKUDA et coll.

Le sang est récolté par ponction de la veine jugulaire. Il est soit défibriné par agitation, soit recueilli sur héparine.

Sans centrifugation, ni sédimentation, le sang complet est réparti dans des tubes placés à l'étuve à 37° selon une inclinaison de 30°. Dans cette technique, les leucocytes forment une fine couche en demi-cercle et se fixent sur la paroi du verre. Les polynucléaires ne se fixent pas et sont éliminés lors du changement de milieu.

TOKUDA et coll. ont essayé les sérums de différentes espèces animales comme les bovins, le porc, le cheval, le mouton, le chien, le lapin, le cobaye afin de déterminer quel était le meilleur pour la culture de leucocytes et quelle était sa concentration optimale. Ils ont constaté que les résultats les plus intéressants étaient obtenus avec le sérum de bovin utilisé à la concentration de 80 p.100.

- Technique de culture de leucocytes bovins selon KONO.

Cette technique a été utilisée pour la production rapide d'interféron. Avant la mise en culture la proportion de polynucléaires était de 30 p.100 et celle des mononucléaires de 70 p.100. Après un jour de culture, 95 p.100 des cellules sont représentées par des mononucléaires fixés sur la paroi du verre. Ultérieurement cette proportion augmente encore et passe à 100 p. 100.

4°) Culture de leucocytes de poulet.

DUNNE et coll. ( 25 ) ont employé la technique suivante : le sang est récolté par ponction cardiaque, puis défibriné par agitation. Il est ensuite filtré sur gaze stérile puis centrifugé de façon à séparer les leucocytes pour les mettre en suspension dans du sérum de poule à la concentration voulue. Les suspensions de leucocytes sont ensuite réparties dans les tubes, puis placées à l'étuve à 37°.

Comme pour les autres espèces, les cellules qui se fixent sur la paroi du verre sont essentiellement représentées par des mononucléaires.

D'autres essais ont été effectués avec des leucocytes d'autres espèces animales, en particulier le lapin, le mouton, le singe, etc... Cependant, ces techniques n'ont aucun caractère d'originalité et par conséquent n'apportent pas d'élément nouveau pour notre sujet.

Il est beaucoup plus intéressant de considérer les différents essais, réalisés notamment par les auteurs japonais, pour la culture de leucocytes de cheval puisque tel est notre sujet principal de recherche.

## B. Etude particulière de la culture des leucocytes de cheval.

Cette étude sera envisagée en suivant les points les plus importants, à savoir : la mise en culture, les milieux employés, la concentration leucocytaire optimale et l'influence du sujet donneur de leucocytes.

### 1°) Modalités de mise en culture.

Les travaux de KOBAYASHI ( 54 ), WATANABE ( 104 ), LIVINGSTON et coll. ( 63 ) et DESCARPENTRIES ( 20 ) sont consacrés à l'étude de la culture de leucocytes destinés à la réplication du virus de l'Anémie Infectieuse.

#### a) Technique de KOBAYASHI

Dès 1961, KOBAYASHI obtenait régulièrement la culture de leucocytes de cheval. Sa technique est la suivante :

Le sang est récolté sur héparine, à raison de 4 U. par ml. On le laisse sédimenter 30 à 40 mn à la température du laboratoire, puis on prélève le plasma renfermant les leucocytes. Le plasma est centrifugé à 1000 ou 1500 tours/mn pendant 7 mn, puis on lave les leucocytes dans un même volume de liquide de Hanks, fois grâce à une centrifugation à la même vitesse pendant le même temps. On met ensuite les leucocytes en suspension dans un milieu constitué par du sérum pur de veau, sérum inactivé à 56° pendant 30 mn. La plus longue survie des leucocytes est en effet assurée par le sérum non dilué.

La suspension leucocytaire est répartie dans des tubes à essais à raison de 0,5 ml par tube. Ces tubes sont bouchés, puis placés à l'étuve à 37°. Le lendemain, on change le milieu, ce qui a pour effet d'éliminer tous les leucocytes non fixés sur la paroi des tubes. Le milieu est ensuite changé une fois par semaine.

#### b) Technique de WATANABE

La mise en culture est identique à la précédente. Le milieu de culture est différent (cf. plus loin).

c) Technique de LIVINGSTON et coll.

Ces auteurs recueillent 130 ml de sang de cheval sur héparine, à raison de 0.4 mg d'héparine par ml de sang. Le sang est transvasé dans un flacon stérile refroidi au préalable à +4°. Le prélèvement est laissé pendant 1 heure à la température de +4° pour que la sédimentation intervienne. Puis, le plasma renfermant les leucocytes est prélevé avec précaution. A une partie de plasma, on ajoute 4 parties de milieu de culture 199 de PARKER additionné de 0,5 p.100 d'hydrolysat de lactalbumine, de 200 unités de pénicilline et de 100 µg de streptomycine par ml. L'ensemble est mélangé, puis réparti en fractions de 15 ml dans des flacons de culture bouchés et placés horizontalement à l'étuve à 37°.

Après 24 h. d'étuve, le milieu initial est éliminé et les cellules sont lavées 3 fois à l'aide de milieu neuf, avant de renouveler le milieu de [illegible].

d) Technique de DESCARREUTHIES.

Le sang est recueilli sur héparine à raison de 0,2 ml d'hépari- [illegible].

[illegible] (3 ml) qui sont déposés à l'étuve à 37°, inclinés à 40°. Après 48 h. de culture, DESCARREUTHIES introduit de la phytohémagglutinine dans les tubes. Le troisième jour les cellules sont lavées à l'aide du milieu de Eagle avant d'introduire le milieu de culture. Ultérieurement le milieu est changé tous les deux jours.

Cette technique est très voisine de celle de TOKUDA ( 94 ) pour la culture des leucocytes bovins.

e) Milieux de culture utilisés

[illegible] ( 54 ) a étudié les différents facteurs qui conditionnent la valeur des milieux de culture utilisés. Il a, en particulier, comparé les résultats obtenus avec le milieu 199 de PARKER et le milieu de HANKS. Par ailleurs, il a envisagé l'emploi du sérum de diverses espèces animales, notamment mouton, boeuf, cheval. Enfin, il a recherché la concentration optimale de sérum dans la culture.

Les résultats obtenus par cet auteur sont les suivants :

1) le milieu de Hanks a donné de meilleurs résultats que le milieu I99 de PARKER.

2) Les sérums de bovins ou d'ovins se sont révélés supérieurs à celui du cheval.

3) Enfin, les résultats optimaux étaient observés avec la plus forte concentration de sérum dans la culture. Lorsque la concentration de sérum est inférieure à 50% les résultats sont défavorables et les leucocytes ne peuvent guère survivre plus de 6 jours. Dans ces conditions, KOBAYASHI recommande l'emploi du sérum de mouton ou de bovins à la concentration la plus forte possible.

[illegible] ( 104 ) a utilisé comme milieu de culture le milieu I99 de PARKER additionné de 40 p.100 de sérum de veau. Cet auteur insiste sur la nécessité de ne pas filtrer le sérum de veau employé et de le décomplémenter par chauffage pendant 30 à 40 mn à une température de 50 à 60°.

L'étude comparée de la composition des sérums et de leur valeur pour la culture des leucocytes permet d'aboutir à la conclusion que <u>les sérums les plus aptes à la culture des leucocytes de cheval contiennent un faible pourcentage d'albumine et de bétaglobuline et au contraire une forte proportion de globuline alpha</u>.

LIVINGSTON ( 63 ) a employé un milieu constitué d'une partie du plasma du cheval fournissant les leucocytes et de 4 parties de milieu I99 de PARKER additionné de 0,5 p.I00 d'hydrolysat de lactalbumine.

Enfin DESCARPENTRIES a utilisé un milieu constitué par un mélange de 25 p. I00 de milieu de Eagle, 25 p.I00 de sérum de veau et 50 p. I00 de plasma provenant du cheval ayant fourni les leucocytes. DESCARPENTRIES n'introduit pas d'antibiotiques dans le milieu de culture.

3°) <u>Concentration des leucocytes</u>.

KOBAYASHI a fait varier les concentrations de leucocytes afin de déterminer la dose optimale pour les cultures cellulaires. Les concentrations retenues étaient comprises entre 2 x $10^6$ et 2 x $10^8$ leucocytes par ml. Les résultats les meilleurs sont obtenus avec une concentration de 2 x $10^7$ cellules par ml.

orsque la quantité de leucocytes introduite dans les tubes est supérieure à $10^8$ cellules par ml ou inférieure à $10^7$, les résultats sont moins favorables.

Les autres auteurs ont utilisé soit la mise en culture du sang total sans numération ou concentration des cellules (DESCARPENTRIES), soit la dilution de la suspension des leucocytes dans des proportions fixes (4 fois) dans le milieu de culture (LIVINGSTONE).

4°) Chevaux donneurs de leucocytes.

KOBAYASHI et KONO ( 54 ), WATANABE ( 104 ) ont insisté sur plusieurs conditions à respecter pour obtenir d'excellentes cultures de leucocytes.

La première recommandation concerne le choix du cheval donneur de cellules.

Ils ont pu, en effet, démontrer l'existence de grandes variations d'un sujet à l'autre dans l'aptitude à fournir des leucocytes demeurant très longtemps en survie.

Il n'a pas été possible à ces auteurs de trouver une relation entre cette aptitude et les antécédents normaux ou pathologiques des sujets (âge, nutrition, maladie...).

Il est donc nécessaire lorsque l'on désire obtenir une survie maximale des leucocytes en culture, de comparer les cellules de plusieurs chevaux afin de sélectionner l'animal producteur des éléments les plus aptes et de ne plus utiliser comme donneur que cet animal (cf. tableau I).

Tableau 1 : RESULTATS DES CULTURES LEUCOCYTAIRES DE DIFFERENTS CHEVAUX.
d'après WATANABE (104)

| heval n° | 35 | 36 | 37 |
|---|---|---|---|
| ombre de eucocytes | 2,2 x $10^7$/ml | 2,1 x $10^7$/ml | 2,3 x $10^7$/ml |
| 1 | +++ +++ +++ +++ ++++ +++ +++ +++ +++ +++ | ++++ +++ ++++ ++++ ++++ ++++ ++++ ++++ ++++ +++ | +++ ++++ +++ +++ ++++ +++ ++++ ++++ +++ +++ |
| rs de 2 | +++ +++ +++ ++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ | ++++ +++ ++++ ++++ ++++ ++++ ++++ ++++ ++++ +++ | +++ ++++ +++ +++ ++++ +++ +++ ++++ +++ ++ |
| ture 3 | +++ +++ +++ ++ +++ +++ +++ +++ ++ +++ | ++++ +++ ++++ ++++ ++++ ++++ ++++ ++++ ++++ +++ | ++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ ++ |
| 4 | +++ +++ +++ ++ +++ +++ +++ +++ ++ +++ | ++++ +++ ++++ ++++ ++++ ++++ ++++ ++++ ++++ +++ | + ++ + +++ +++ + + + + + |
| 5 | ++ +++ ++ ++ +++ +++ +++ +++ ++ ++ | ++++ +++ ++++ ++++ ++++ ++++ ++++ ++++ ++++ +++ | + + + ++ ++ + + + + + |
| 6 | ++ +++ ++ ++ +++ +++ ++ +++ + ++ | ++++ +++ ++++ ++++ ++++ ++++ ++++ ++++ +++ +++ | - + - + + - - + - - |
| 7 | + + + ++ ++ +++ + ++ + + | ++++ +++ ++++ ++++ ++++ ++++ ++++ ++++ +++ +++ | + + + - |
| 8 | + + + + + ++ - + + + | ++++ +++ ++++ ++++ ++++ ++++ ++++ ++++ +++ +++ | - - |
| 9 | - - - + + + + + + | ++++ +++ ++++ ++++ ++++ ++++ ++++ ++++ +++ +++ | |
| 10 | + + - - - + | ++++ +++ ++++ ++++ ++++ ++++ ++++ ++++ +++ +++ | |
| 11 | + + - | ++++ +++ ++++ ++++ ++++ ++++ ++++ ++++ +++ +++ | |
| 12 | + + | ++++ +++ ++++ ++++ ++++ ++++ ++++ ++++ +++ +++ | |
| 13 | - - | ++++ +++ +++ +++ ++++ ++++ ++++ ++++ +++ +++ | |
| 14 | | ++++ +++ +++ ++++ ++++ ++++ ++++ ++++ +++ +++ | |

++++ : Très bon aspect des cellules
+ : cellules en voie de dégénérescence
+++ ++ : stades intermédiaires
- : Détachement des cellules de la paroi de verre.

## II. Connaissances acquises sur le virus de l'anémie infectieuse des équidés.

L'étude du virus de l'anémie infectieuse est encore très incomplète. Les lacunes relatives à sa connaissance s'expliquent par les difficultés de culture et de purification de l'agent pathogène et par l'impossibilité d'étudier le virus sur une espèce animale de laboratoire régulièrement sensible.

A fortiori la place du virus dans la taxonomie ne peut-elle être précisée...

Nous allons passer en revue les principales propriétés du virus de l'anémie infectieuse, laissant la première place à celles qui ont été étudiées par culture du virus en culture de leucocytes de cheval.

Nous ferons de larges emprunts à la monographie de GORET, MICHEL et TENA ( 23 ) parue récemment.

### A. Propriétés physiques et action des agents physiques.

#### 1. Filtration

TALLEE et CARRE ( 98 ) établissent, les premiers, le caractère filtrable de l'agent infectieux de la maladie et montrent qu'il traverse les bougies Berkefeld de porosité légèrement supérieure à celle du type V et les filtres Chamberland L3.

Le virus ne traverse pas les membranes de collodion ( 62 ) de porosité inférieure à 20 mμ. Il traverse, par contre, les membranes d'Elford. Ses dimensions appréciées par cette dernière technique sont comprises entre 18 et 50 mμ ( [illegible] ).

#### 2. Ultracentrifugation.

[illegible] et [illegible] ( 70 ) estiment, par ultracentrifugation, les dimensions de [illegible] entre 60 et 95 mμ. Travaillant sur un virus adapté à la souris blanche, ARAKAWA et coll. ( 1 ) trouvent pour celui-ci des dimensions variant entre 20 et 60 mμ. Sa constante de sédimentation de 62 S ( 46 ) n'a pu être confirmée ( 13 ). A l'aide d'une technique combinant l'ultracentrifugation, la chromatographie sur colonne de diethylaminoéthyl cellulose (DEAE) et la centrifugation en gradient de densité de saccharose, NAKAJIMA et coll. ( 79 )

en I967 ont pu concentrer mille fois en virus un sérum virulent.

L'année suivante, NAKAJIMA et coll. ( 78 ) ont étudié le virus de l'anémie infectieuse par centrifugation en gradient de densité de chlorure de césium. Ils ont obtenu, pour la densité du virus, des chiffres compris entre I,I4 et I,20 g/ml avec un pic à I,I6 et I,I7 g/ml. Ces auteurs concluent que la technique de centrifugation en gradient de densité de chlorure de césium peut être appliquée à la purification du virus.

3) Adsorption.

Le virus s'adsorbe sur particules de noir animal, sur kaolin, sur hydrate d'alumine, sur hématies de cheval et plus irrégulièrement sur hématies de poulet.

La chromatographie d'un sérum virulent sur colonne de DEAE cellulose montre que le virus s'élue en solution de chlorure de sodium 0,2 - 0,5 M ( 93 ).

Utilisant une technique de fractionnement de sérum virulent par élution après adsorption sur colonnes de DEAE sephadex, de DEAE cellulose ou de sephadex G 200, BURGER et coll. ( 15 ) ont établi que le virus était présent dans les fractions contenant la sérumalbumine et les macroglobulines.

4) Action de la température.

Le virus contenu dans le sang résiste plus d'un mois à la température du laboratoire ( 16 ). NAGAO ( 74 ) admet même que, à cette température, la virulence se maintient pendant un an.

Entre 0° et + 2°C, le virus conserve sa virulence deux ans et à - I5°C quatre ans. A -30°C et -70°C, le virus demeure virulent plusieurs années ( 35 ).

A 56 ou 58°, le virus résiste une heure ( 40 ), mais il est inactivé, durant le même temps, à 60°C ( 19 ) ou en quelques minutes à I00°C ( 16 ). Une stérilisation absolue est obtenue par ébullition pendant I5 mn. ( 48 ).

5) Action des radiations.

L'agent de la maladie de VALLEE est très résistant aux rayons ultra-violets ( 7 ). Il est capable de résister à une faible irradiation par rayons X ( 69 ).

B. Morphologie.

La morphologie du virus de l'anémie infectieuse est très mal connue. Des particules virales ont simplement été "aperçues" semble-t-il, au microscope électronique par divers chercheurs.

REAGAN et coll. ( 84 ) observent ainsi des particules sphériques dans le sédiment obtenu par centrifugation à 52.000 tours/minute pendant 3 heures, de sérum de cheval infecté ; ces particules auraient des dimensions comprises entre II et 59 mμ.

ISHII et coll. ( 45 ) notent également que le sérum de cheval infecté renferme des particules de 20 à 50 mμ visibles au microscope électronique après ultracentrifugation. BEUST ( 13 ) n'obtient aucune image virale dans ces mêmes conditions.

TABUCHI et coll. ( 92 ) opérant sur un matériel virulent représenté par des cellules du système réticulo-histiocytaire, détruites par ultrasons et centrifugées, remarquent au microscope électronique, des particules sphériques ayant un diamètre moyen de 22 mμ . Des chevaux traités avec ce même matériel dilué à $10^{-5}$, réagissent par des signes cliniques superposables à ceux de l'anémie infectieuse. Il semble toutefois, à la lumière d'essais ultérieurs, que des éléments de ferritine aient été pris pour des particules virales lors de l'examen microscopique. Des recherches s'avèrent nécessaires ( 44 ) pour séparer plus sûrement les particules de ferritine de celles susceptibles de représenter le virion.

CLEINIK ( 81 ) retrouve dans les hématies hémolysées de cheval, des corpuscules de 50 mμ de diamètre, présumées être le virus de l'anémie infectieuse.

Enfin GAINER ( 30 ) décrit dans le foie de chevaux atteints d'anémie infectieuse une disposition en mosaïque de particules de 25 mμ ressemblant à des virus et décelées grâce au microscope électronique.

A l'analyse de toutes ces expériences, on ne peut qu'être frappé de la disparité des résultats obtenus et de l'absence d'élément de référence pour juger de la morphologie du virus.

C. Propriétés chimiques et action des agents chimiques.

La constitution chimique du virus, la nature de son acide nucléique demeurent actuellement inconnus.

Le chloroforme ( 19 ) ( 39 ) ( 4 ), le toluène ( 19 ), la glycérine ( 5 ), le fluorure de sodium ( 3 ) semblent pratiquement sans action sur le virus.

Contrairement aux observations antérieures ( 3 ), il a été récemment prouvé que le virus est sensible à l'éther : traité par cette substance, le virus de l'anémie infectieuse se montre incapable de reproduire la maladie après inoculation au cheval réceptif ( 75 ).

L'action du phénol et celle du formul varient selon la concentration de ces produits et la température à laquelle on les fait agir sur le virus.

La saponine à I p.100 entraîne la destruction du virus en moins de 24h. ( 10 ) ; le ricinoléate de sodium à I p.100 l'inactive en moins de 15 mn ( 6 ). Le taurocholate de sodium à la concentration de 2,5 p.100 dans le sérum est actif ( 19 ). En revanche, la bile se montre sans effet ( 3 ).

NAKAJIMA et coll. ( 77 ) ont récemment étudié l'action de la trypsine, de la ribonucléase et de la désoxyribonucléase sur le virus. Ce dernier s'est montré résistant à l'action de la trypsine. La ribonucléase et la desoxyribonucléase à une concentration de 20 μg/ml ne modifient pas le titre du virus.

D. Culture du virus.

Nous envisagerons successivement la culture du virus in vivo, in ovo et en culture cellulaire, en développant largement ce dernier aspect.

1) Culture in vivo

De très nombreux essais portant sur les espèces animales les plus diverses ont été entrepris. De l'ensemble de ces expériences rapportées dans la monographie de COHET et coll. ( 33 ) on peut extraire la conclusion de ces auteurs : "L'unanimité semble se faire à l'heure actuelle sur la notion suivante : aucune espèce animale, en dehors des équidés, n'est régulièrement sensible à l'inoculation du virus de l'anémie infectieuse".

Dans ces conditions, on comprend les difficultés qu'ont éprouvé les différents chercheurs, à mettre en évidence la présence du virus dans un prélèvement ou dans une substance, et par suite, tout l'intérêt qui s'attache à l'obtention de culture virale en culture cellulaire.

2) Culture in ovo

La culture du virus sur membrane chorio-allantoïdienne d'embryon de poulet a été tentée pour la première fois par PINUS et PIROG ( 83 ). Elle a été reprise ultérieurement mais sans succès ( 38 ).( 89 ).

Outre la membrane chorio-allantoïdienne, d'autres voies d'inoculation ont été essayées : cavité allantoïde, sac vitellin, voie veineuse. La réinoculation ultérieure au cheval ne provoque que des réactions thermiques et hématologiques discrètes et les tests d'hémagglutination, auxquels se fient les auteurs, témoignent de l'échec de ces tentatives ( 24 ).

De même l'injection d'un virus concentré et partiellement purifié, sur la membrane chorio-allantoïdienne, dans le sac vitellin, ou dans la veine, n'a abouti qu'à des échecs lors du contrôle par inoculation au cheval neuf ( 90 ).

Un virus fixe semble toutefois avoir été obtenu au bout de 8 passages sur oeuf embryonné ( 2 ).

3) Culture en culture cellulaire.

De très nombreuses cellules ont été étudiées en vue d'obtenir la réplication du virus de l'anémie infectieuse.

En 1950, WATANABE (100,101,102) employait des cellules de coeur, de foie, de rein, de poumon et de rate de foetus d'un poulain âgé de 10 mois. KOBAYASHI ( 49 ) a utilisé la glande surrénale, le rein, les ganglions lymphatiques et la rate de poulain. Aucun effet cytopathogène n'apparaissait dans les cultures de ces différents types de cellules. Cependant, le virus avait dû se multiplier puisque des inoculations à des chevaux sains de liquides de culture du cinquième passage, pour le premier auteur, du huitième passage, pour le second, se révélaient positives et provoquaient l'apparition des signes cliniques de la maladie.

D'après SATRINO et coll. ( 87 ), les cellules KB permettraient également la réplication du virus qui, après inoculation, exercerait un effet cytopathogène. Selon ces auteurs, certaines souches ont été passées jusqu'à 25 fois sur cellules KB. Grâce à des dilutions progressivement croissantes de sérum de chevaux malades, SATRINO et coll. ont déterminé le titre en virus des sérums sur cultures de cellules KB. Pour des dilutions assez fortes des sérums, la dégénérescence des cellules apparaît en foyers qui augmentent progressivement de taille jusqu'à confluer.

Les titres obtenus par ces auteurs varient de $10^{2,5}$ à $10^{4,7}$/ml.

SATRINO et coll. ( 87 ) auraient également obtenu une réplication [illegible] dans des cultures de cellules HeLa, de [illegible] de poulet.

Les résultats [illegible] du virus en culture de [illegible] ont été confirmés.

[illegible] ( 31 ) une multiplication [illegible] de cheval et une interférence avec le virus vaccinal après le passage dans ces cellules.

A l'heure actuelle, les cellules de choix pour la réplication [illegible] in vitro sont les cellules de moelle osseuse et surtout les leucocytes de cheval. De nombreux auteurs, en particulier les chercheurs japonais, ont essayé de [illegible] les conditions d'une telle culture.

a) Effet cytopathogène.

En 1961, KOBAYASHI ( 50 ) obtenait un effet cytopathogène sur des cellules de moëlle osseuse de poulain, une à deux semaines après l'inoculation des cultures cellulaires. L'inoculation au cheval d'un ml de surnageant de culture du huitième passage provoquait l'apparition de la maladie. La même année, KOBAYASHI réussissait 17 passages du virus en cultures de leucocytes de cheval avec apparition d'effet cytopathogène ; ce dernier se traduit par une dégénérescence des cellules et leur détachement de la paroi de verre. L'action sur ces cellules n'est cependant pas aussi marquée qu'avec la plupart des virus cytopathogènes car les lésions apparaissent tardivement (rarement avant le 7e jour) et la comparaison avec les tubes de cellules témoins est toujours nécessaire. Cette comparaison doit permettre en particulier d'éviter la confusion avec un éventuel effet cytopathogène dû à un virus "orphelin" présent chez les chevaux sains ayant fourni les leucocytes. KONO et KOBAYASHI ( 57 ) ont en effet signalé l'isolement de plusieurs souches de virus orphelins cytopathogènes en cultures de cellules équines. TOKUI ( 107 ) a rapporté aussi l'isolement, à partir de dix cultures de leucocytes provenant de chevaux sains différents, de huit souches de virus inconnus doués d'effet cytopathogène.

WATANABE ( 103 ) obtient une destruction des cellules en 11 jours.

ISHITANI ( 47 ) observe 7 à 9 jours après l'inoculation du virus en culture de leucocytes, une agglomération, une dégénérescence et un détachement des cellules de la paroi du verre.

MOORE ( 71 ) note un effet cytopathogène sur les leucocytes de cheval, caractérisé par une migration des leucocytes et la formation de petits amas de cellules séparés entre eux par des zones dépourvues de cellules.

KOBAYASHI et KONO ( 53 ) résument ainsi les principaux aspects de l'effet cytopathogène : apparition de cellules globuleuses, à structure granulaire, agglomération des cellules dégénérées, puis détachement du verre.

Les quatre souches employées par ces auteurs, souches German, Goshun, New-Hampshire et Wyoming provoquent exactement le même effet cytopathogène en culture de leucocytes.

L'effet cytopathogène apparait plus rapidement lorsque le virus a subi plusieurs passages en cellules. Ainsi KOBAYASHI et KONO ( 54 ) obtiennent un effet cytopathogène en 10 à 14 jours après inoculation du sérum du cheval infecté à des leucocytes ; lorsque ces cellules sont infectées à l'aide d'une souche de virus ayant déjà effectué 10 passages en culture de leucocytes, l'effet cytopathogène apparait au 6e jour après l'inoculation lorsque la concentration de l'inoculum est importante, et environ en 2 semaines lorsque de faibles quantités de virus sont inoculées aux cellules.

Ces cultures ont également montré la variation de réceptivité des leucocytes en fonction de l'âge de la culture. Ainsi, plus les cellules sont infectées tardivement après leur mise en culture, plus l'effet cytopathogène apparait lentement ; il est donc souhaitable d'infecter les leucocytes peu de temps après leur mise en culture.

KOBAYASHI et KONO ( 54 ) ont enfin indiqué l'action de la température de culture sur l'apparition de l'effet cytopathogène. Lorsque les cellules sont portées à une température de 40°, l'effet cytopathogène apparait plus vite et il est plus prononcé.

[illegible]

[illegible] ( 59 ) réussissait [illegible] passages en série du virus en culture de [illegible] ( 107 ) réussissait [illegible] passages dans le [illegible].

[illegible] ( 103 ) passait la souche Wyoming et la souche Goshun 6 fois en culture de leucocytes de cheval.

[illegible] fait état de passage en série de 6 souches de l'anémie infectieuse avec un nombre de passages compris entre 30 et 70.

[illegible] ( 11 ) [illegible] en série de [illegible].

[illegible] ( 59 ) réussissaient plus récemment, 40 passages en série [illegible] pour les souches Goshun, New Hampshire [illegible].

c) Vérification de la réplication virale en culture de leucocytes de cheval par inoculation au cheval.

A l'heure actuelle, l'inoculation en retour au cheval reste indispensable pour prouver la réplication virale en culture de leucocytes de cheval.

Tous les auteurs cités ci-dessus ont montré le succès de leur culture en inoculant des animaux sains et en observant l'apparition de la maladie.

Les passages en série en culture de leucocytes ne semblent pas modifier le pouvoir pathogène du virus pour le cheval. KOBAYASHI et KONO (51,52)[54] ont inoculé à des chevaux quatre souches d'anémie infectieuse passées de nombreuses fois en culture de leucocytes. La souche Wyoming a été inoculée après 15 à 40 passages ; 3 autres souches Goshun, New Hampshire et German ont été inoculées aux chevaux entre le 10e et le 17e passage.

Tous les chevaux soumis aux inoculations (19 animaux) ont présenté des symptômes de la maladie. La période d'incubation était de deux semaines environ pour les chevaux recevant une faible dilution de virus, et de trois à quatre semaines pour les animaux ayant reçu le virus à plus forte dilution.

Il semblerait donc qu'il soit nécessaire de parvenir à un nombre de passages nettement plus élevé pour obtenir peut-être une atténuation de la virulence pour le cheval.

d) Titrage du virus.

En dépit de l'absence actuelle d'une éventuelle immunisation active par virus modifié, la culture sur cellules du virus de l'anémie infectieuse permet d'envisager plusieurs applications pratiques. L'une d'entre elles concerne le titrage du virus ; KOBAYASHI et KONO (53,[illegible]) ont obtenu des résultats comparables par titrage du virus sur cellules et par inoculation au cheval. Ils considèrent qu'il est actuellement possible de se passer du cheval pour un tel titrage, et que l'appréciation de l'[illegible] sur cellules recevant différentes dilutions du matériel [illegible] se substituer à l'emploi onéreux du seul animal réceptif en l'état actuel de nos connaissances.

Le titre obtenu par ces auteurs en culture de leucocytes de cheval était compris entre $10^{4,5}$ et $10^{5,5}$ D.E.C.P. 50 (dose effet cytopathogène pour 50 p.100 des cellules).

Lors du titrage, l'effet cytopathogène apparait en 4 à 5 jours aux faibles dilutions et entre II et I9 jours aux fortes dilutions. En général, le titre peut être obtenu au bout de 2 semaines. En effet, si l'on prolonge la période d'observation, des altérations non spécifiques peuvent survenir dans les cultures témoins non infectées et rendre les résultats difficilement interprétables.

e) Interférence avec d'autres virus.

Des artifices ont été utilisés pour révéler plus facilement la présence du virus au sein des cellules.

Ainsi GAINER et coll. ( 31 ) font état d'une interférence entre le virus de l'anémie infectieuse passé en culture de thymocytes de cheval et le virus vaccinal.

Par la technique des plages, ils obtiennent une réduction de 50 p.100 des plages obtenues avec le virus vaccinal lorsque les cultures ont été infectées antérieurement par le virus de l'anémie infectieuse.

Cette réduction est inhibée par l'emploi d'un sérum contenant des anticorps anti-virus de l'anémie infectieuse.

A notre connaissance, aucun autre essai en vue de rechercher une éventuelle interférence entre le virus de l'anémie infectieuse et un autre virus n' a été publié.

Il serait intéressant de poursuivre de telles études afin de savoir si ce virus n'est pas capable soit d'inhiber la croissance, soit au contraire d'exalter l'effet cytopathogène d'un autre virus bien connu, par analogie au RIF Test (Resistance Inducing Factor) ou au E.N.D.V. test (Enhancement of Newcastle Disease virus).

E. Virulence.

La mesure de la virulence d'une souche de virus de l'anémie infectieuse est difficile, sinon impossible. En effet, ni la forme clinique de la maladie apparue apres inoculation, ni la longueur de l'incubation, ne permettent de porter un jugement définitif sur l'agressivité d'une souche. Ainsi, du sang prélevé chez un animal atteint d'une infection inapparente, provoque chez des chevaux des formes graves rapidement mortelles en même temps que des formes légères et ce, semble-t-il, dans la même proportion que le ferait le sang prélevé au cours d'un accès violent chez un animal atteint d'une forme aiguë ( 10 ). On ne peut guère tenir compte de la durée de l'incubation pour apprécier la virulence.

Les différentes tentatives d'atténuation de la virulence par passages en série sur animaux, in ovo ou en culture cellulaire se sont jusqu'à présent soldées par des échecs. Les variations quantitatives de la virulence paraissent donc relativement limitées.

F. Pouvoir antigène.

L'étude du pouvoir antigène du virus de l'anémie infectieuse se heurte à la difficulté, voire l'impossibilité, d'obtenir des préparations suffisamment concentrées et pures de virus.

Le virus de l'anémie infectieuse possède un pouvoir antigène assez faible. Certes, son inoculation à un animal entraine la formation d'anticorps révélables par différentes techniques ; il n'en demeure pas moins que ces anticorps n'apparaissent qu'à de faibles taux. La faiblesse du pouvoir antigène est à l'origine de l'absence actuelle de méthode de diagnostic sérologique pleinement valable.

Dans le sérum d'animaux infectés expérimentalement, on peut mettre en évidence les anticorps suivants :

- anticorps fixant le complément : ces anticorps ne sont pas révélés aussi facilement que dans d'autres maladies virales et de nombreux

auteurs ont émis des opinions contradictoires sur la valeur de la réaction de fixation du complément depuis les travaux initiaux.

Les anticorps fixant le complément semblent n'apparaître qu'après la première crise, et ce, pendant un temps relativement court. Lors des crises ultérieures, ils font défaut.

- anticorps précipitants qui sont à l'origine d'une technique de diagnostic par recherche des précipitines en milieu liquide.
- anticorps hémagglutinants.
- anticorps neutralisants.

La présence d'anticorps neutralisants dans le sérum d'animaux atteints d'anémie infectieuse demande encore confirmation. Il semble, en effet, que l'on se heurte au paradoxe suivant : comment peut-on concevoir l'existence concomitante dans le sang d'un animal, d'une part du virus de l'anémie infectieuse constamment présent, d'autre part d'anticorps neutralisants ?

G. Pouvoir immunisant.

Le virus de l'anémie infectieuse provoque chez les animaux, naturellement ou expérimentalement infectés, l'installation d'un état d'immunité de surinfection. Il semble que cette résistance soit due à un phénomène de prémunition puisque, d'une part, le virus est toujours présent dans l'organisme et que, d'autre part, les tentatives de vaccination d'un animal à l'aide de virus inactivé n'ont toujours échoué.

Dès 1906, CARRE et VALLEE ( 17 ) avaient établi cette notion en montrant qu'un animal infecté pouvait recevoir, par voie parentérale, des inoculations de virus en très grande quantité sans en être affecté. Le cheval apparemment guéri, ces auteurs ont pu inoculer, en plusieurs fois, un volume total de 5.700 ml de sérum virulent sans provoquer le moindre trouble.

Chez l'âne, les réinoculations paraissent, sans certaines cas, donner des résultats différents ( 4 ).

Diverses études ont porté sur le problème de l'unicité ou de la pluralité du virus de l'anémie infectieuse ( 68 ). Elles sont à considérer avec une certaine prudence en raison d'une part, de la méthode employée

(anticorps neutralisants), d'autre part des variations possibles de virulence selon les différentes souches, variations qui pourraient faire conclure, à tort, à des spécificités immunogéniques distinctes.

L'épreuve de neutralisation réalisée au moyen de sérums de chevaux ayant reçu, l'un la souche Californie, l'autre la souche Wyoming, a permis de constater que le sérum de cheval guéri de l'infection par la souche Wyoming possède un pouvoir neutralisant vis à vis des 2 souches tandis que le sérum du cheval guéri de l'infection par la souche Californie ne neutralise pas les virus Wyoming et New Hampshire ( 88 ).

Au Japon, deux chevaux initialement infectés avec le virus de l'anémie infectieuse, souche Australie, sont infectés par la souche Wyoming. L'un présente de l'hyperthermie, l'autre ne manifeste aucune réaction. Parallèlement, deux chevaux infectés avec le virus Goshun isolé au Japon ne montrent aucun signe clinique après une inoculation seconde du virus d'origine australienne.

Ces différents essais demeurent limités quant au nombre d'animaux utilisés et surtout quant aux données quantitatives de la séro-neutralisation. Ils demandent donc une grande prudence d'interprétation et nécessitent des recherches ultérieures pour affirmer ou infirmer l'existence de "types" de virus de l'anémie infectieuse à partir des souches déjà reconnues.

H. Pouvoir allergène.

Pour certains auteurs ( 24 ) le virus provoquerait l'apparition d'anticorps allergisants responsables des "crises" à répétitions traduisant l'état d'hypersensibilité.

Le virus de l'anémie infectieuse nous apparait donc comme un des virus animaux les plus mal connus et les plus déroutants. Cette notion se retrouve sous la plume de SAURINO et coll. ( 87 ) : "I think, probably the virus of equine infectious anemia is one of the most interesting, intriguing, enticing, exciting and hearthreaking, I've ever worked with".

# DEUXIEME PARTIE

# RECHERCHES PERSONNELLES

# INTRODUCTION

## But du travail et ensemble des recherches entreprises.

L'étude bibliographique des publications relatives à la structure et aux propriétés du virus de l'Anémie Infectieuse des équidés nous a révélé combien ce virus était mal connu. Nous avons donc tenté d'apporter une modeste contribution à la connaissance de ce virus zoophile.

La première étape de ces recherches passe forcément par l'obtention d'un matériel viral le plus concentré et le plus pur possible.

En effet, jusqu'à présent, les différents auteurs qui ont étudié le virus de l'anémie infectieuse ne disposaient que d'un matériel relativement impur constitué par du sérum d'animal en crise. Ce n'est cependant qu'à partir d'un matériel relativement purifié et concentré que peuvent être envisagées des études de la structure et des propriétés physico-chimiques du virus ainsi que de son pouvoir antigène.

Par ailleurs, à l'instar d'autres virus, le passage en série de l'agent de la maladie en culture de cellules permet de concevoir une éventuel modification du pouvoir pathogène intéressante sur le plan de la prophylaxie médicale.

Pour ces différentes raisons, il apparait à l'évidence que l'obtention d'une culture du virus était la première étape à franchir avant de passer à une étude de son propriétés.

L'étape préliminaire consistait alors en la réalisation de façon répétée de cultures de leucocytes de cheval restant en survie pendant plusieurs semaines. En effet, tous les travaux des auteurs japonais ont montré que l'on ne pouvait espérer obtenir une multiplication du virus de l'anémie infectieuse que dans ces cellules. Les autres travaux, en particulier ceux de SAURINO ( 87 ) portant sur des cellules KB, non seulement n'ont donné lieu jusqu'à présent à aucune confirmation mais encore ont été infirmés par certains.

Le plan de notre travail a donc été, et celui de notre exposé sera le suivant : dans un premier temps, les expériences ont porté sur la détermination des conditions optimales des cultures leucocytaires de cheval. Nous avons

repris un certain nombre de techniques ou de modalités retenues par différents auteurs et nous les avons comparées afin d'établir quelle était la meilleure d'entre elles.

Lorsque nous avons pu obtenir de façon régulière de très bonnes cultures de leucocytes, nous avons abordé le deuxième temps de notre travail qui consiste en des passages en série de différentes souches du virus et en l'étude de ses propriétés physiques, chimiques et biologiques. C'est ainsi que nous avons tenté d'apprécier l'effet cytopathogène obtenu sur les leucocytes infectés. Nous avons également recherché quelle pouvait être l'action du virus sur différents systèmes cellulaires afin de vérifier si une lignée cellulaire en particulier, ne permettait pas d'obtenir régulièrement la multiplication du virus de l'anémie infectieuse. Des expériences ont été menées afin de vérifier la taille du virus car les résultats consignés dans la littérature sont loin d'être concordants.

Nous avons également constaté dans la première partie de cette étude que la nature de l'acide nucléique du virus de l'anémie infectieuse était encore inconnue. Pour cette raison, nous avons tenté à l'aide de colorations par l'orangé d'acridine et de l'emploi d'inhibiteurs de l'acide desoxyribonucléique de préciser la nature de cet acide. Enfin, les préparations de leucocytes infectés ont été soumises à l'examen au microscope électronique afin de tenter l'observation, dans la mesure du possible, de particules virales.

I°) <u>Détermination des conditions optimales de culture des leucocytes de cheval.</u>

En possession des résultats obtenus par les auteurs japonais, nous avons dans un premier temps tenté de comparer leurs techniques avec celle de LIVINGSTON et celle de DESCARPENTRIES. Nous avons ensuite étudié l'influence d'un certain nombre de facteurs, comme le milieu de culture utilisé, la concentration leucocytaire, le pH, l'emploi de la phytohémagglutinine et du sérum antilymphocytaire afin de chercher quelles étaient les meilleures conditions d'obtention de cultures de leucocytes de cheval. Ce sont ces techniques que nous allons étudier dans un premier temps, avant d'aborder les résultats qu'elles

nous ont fourni.

A. Matériel et techniques.

1. Matériel.

Le matériel utilisé consiste en différents récipients, en milieux de culture, en animaux et en réactifs.

La verrerie est celle classiquement employée dans un laboratoire de virologie, à savoir : flacons de pharmacie (en particulier pour l'étude au microscope électronique), tubes à essais (notamment pour les passages en série du virus) et tubes à lamelles ou tubes de Leighton qui permettent un excellent examen microscopique de ces cellules et l'appréciation de l'éventuel effet cytopathogène après coloration.

Les milieux de culture employés ont été : le milieu à l'hydrolysat de lactalbumine, l'hydrolysat de caséine, le milieu de Hanks et le milieu de Parker (Institut Pasteur). Le sérum de veau provenait de l'Institut Mérieux.

15 chevaux ont été utilisés pour le prélèvement de sang ; les principales indications concernant ces chevaux, en particulier le sexe, l'âge, la race sont portées dans le tableau 2 .

Le sérum antilymphocytaire de cheval a été préparé sur mouton par injection de lymphocytes provenant du sang circulant( 34 ).

2. Techniques.

a. Mise en culture.

Trois techniques ont été retenues : celle de KOBAYASHI ( 54 ), celle de LIVINGSTON et MOORE ( 63 ) et une technique employée initialement par DESCARPENTRIES ( 20 ).

Nous avons pu ainsi, au cours d'essais répétés, comparer les résultats obtenus à l'aide de ces trois techniques et juger de leur efficacité. Les techniques employées sont résumées dans le tableau 3 .

Après avoir essayé ces trois techniques, nous avons retenu pour la mise en culture des leucocytes de cheval, les modalités suivantes

Tableau 2 : CHEVAUX AYANT FOURNI LE SANG NECESSAIRE POUR LA CULTURE DES LEUCOCYTES.

| m du cheval | Sexe | âge | Race |
|---|---|---|---|
| uir. | Mâle | 16 ans | Française |
| Mag. | Mâle | 13 ans | Française |
| Pam. | Mâle | 17 - | Barbe |
| Pres. | Mâle | 11 - | Anglo-arabe |
| Jlt. | Femelle | 4 - | Française |
| Sul. | Mâle | 9 - | Arabe |
| Cham. | Mâle | 9 - | Barbe |
| Sy. | Mâle | 5 - | Demi-sang |
| Sois. | Mâle | 5 - | Demi-sang |
| Blan. | Mâle | 5 - | Arabe |
| Bab. | Femelle | 4 - | Barbe |
| St T. | Mâle | 5 - | Barbe |
| Ven. | Mâle | 4 - | commune |
| Sol. | Femelle | 6 - | commune |
| Syb. | Mâle | 10 - | commune |

Tableau 3 COMPARAISON DE TROIS TECHNIQUES DE CULTURE DES LEUCOCYTES DE CHEVAL.

| | Technique de KOBAYASHI ( 49 ) | Technique de LIVINGSTON ( 63 ) | Technique initiale de DESCARPENTRIES ( 20 |
|---|---|---|---|
| Héparine | 4 unités/ml | 0,4 mg/50 ml | 0,4 mg/50 ml |
| Sédimentation des globules rouges | 30 - 40 mn à température du laboratoire | 1 heure à + 4°C | 30 mn à 37°C |
| Centrifugation | 1000 - 1500 tours par mn pendant 7 mn. | pas de centrifugation | 1000 tours par mn pendant 7 |
| Lavage des cellules | 2 fois avec Hanks | pas de lavage | pas de lavage |
| Concentration leucocytaire | $2 \times 10^7$/ml | celle du plasma | $1,5 \times 10^7$/ml |
| Milieu employé | sérum de veau : 100 % | 1 partie de plasma du cheval + 4 parties de milieu de culture 199 Parker | milieu de Eagle : 50 %<br>sérum de cheval : 10 %<br>sérum de veau : 40 % |
| Antibiotiques | 100 U. I. de pénicilline + 100 µg de streptomycine par ml | 200 U. I. de pénicilline + 100 µg de streptomycine par ml | pas d'antibiotique |
| Changement de milieu | changement après 24 heures de culture, puis chaque semaine. | changement de milieu après 24 heures de culture. Ultérieurement, pas de changement. | pas de changement de milieu |

Le prélèvement de sang est effectué à la veine jugulaire à l'aide d'aiguilles stériles reliées par un tube en caoutchouc à un flacon stérile contenant de l'héparine à la dose de 0,4 ml pour 50 ml de sang. En général, la quantité d'héparine introduite dans le flacon est de 2 ml, ce qui permet de prélever 250 ml de sang. Le flacon est agité pendant tout le temps du prélèvement afin d'assurer un mélange correct du sang et de l'héparine.

Le sang est ensuite introduit dans une éprouvette graduée stérile placée en position inclinée à 45° à la température du laboratoire. On suit la sédimentation des hématies par mesure toutes les 5 mn de la hauteur du culot de globules rouges. Toutes les 5 mn, on tourne légèrement l'éprouvette de façon à assurer une sédimentation homogène dans toutes ses parties. La courbe de sédimentation est établie comme il a été indiqué précédemment. Chez le cheval, la vitesse de sédimentation est rapide et, en général, le plasma renfermant les leucocytes est prélevé entre 20 et 35 mn. après le début de la sédimentation, c'est-à-dire lorsque la courbe de sédimentation atteint son palier. On récupère alors le plasma en prenant soin de ne pas provoquer de mouvement de liquide à la surface des globules rouges.

Le plasma est alors transvasé dans un pot stérile de 100 ml et centrifugé à la vitesse de 1000 tours/mn pendant 9 mn. à la température ordinaire.

On lave ensuite les leucocytes deux fois, à l'aide de liquide de Hanks porté à 37°.

Après le deuxième lavage, on jette le liquide de Hanks surnageant et on met les leucocytes en suspension dans le milieu de culture. Cette mise en suspension doit être effectuée très soigneusement en aspirant et refoulant de nombreuses fois les 10 ml du milieu de culture destiné à reprendre en suspension les leucocytes, afin d'éviter la formation d'amas de leucocytes dans les tubes de culture. On transfère ensuite cette suspension de leucocytes (10 ml) dans un récipient contenant la quantité de milieu nécessaire pour obtenir une concentration leucocytaire optimale. Cette quantité de milieu est calculée d'après la numération leucocytaire effectuée directement sur le plasma . On mélange alors directement les leucocytes dans la totalité du milieu de culture.

Il faut alors répartir cette suspension de leucocytes dans les différents récipients, de la façon suivante :

- 2 ml par tube pour les tubes ronds de I60 x I6 ou dans les tubes de Leighton ;
- 6 ml par flacon, dans les flacons de 60 ml ;
- I2 ml par flacon dans les flacons de I25 ml.

Les tubes sont ensuite bouchés et placés à l'étuve à 37° en position horizontale. Ces tubes doivent être laissés au repos pendant 24 heures afin de permettre aux cellules de se déposer sur le verre.

Le milieu de culture est renouvelé 24 h. après la mise en culture, après avoir lavé les cellules avec du liquide de Hanks ou avec le milieu complet de culture. Le lavage est effectué en balançant les tubes lentement. On renouvelle le milieu à l'aide de milieu de culture préalablement porté à 37° et distribué en même quantité que précédemment. Les tubes sont de nouveau placés à l'étuve à 37°.

Ultérieurement, le milieu de culture est renouvelé tous les 7 à I0 jours.

b) Milieux utilisés.

Les sérums ont toujours été décomplémentés à 56° pendant 30 mn. Dans la plupart des cas, ils n'étaient pas filtrés, pour suivre les recommandations de WATANABE ( 105 ). Nous avons essayé parallèlement de cultiver des leucocytes de cheval en présence de sérum de veau filtré sur filtre Seitz.

Le milieu de Hanks concentré a été dilué I0 fois dans de l'eau bi-distillée stérile.

Dans tout milieu de culture, on a jouté 200U.I. de pénicilline par ml et I00 µg de streptomycine par ml.

Une série d'expériences a porté sur l'étude de l'influence de l'espèce fournissant le sérum (bovine ou cheval) et, d'autre part, sur l'intérêt d'employer du plasma du cheval ayant fourni la culture de leucocytes.

C'est ainsi qu'ont été étudiés parallèlement les trois milieux suivants :

- Ier milieu :

  50 p.I00 du plasma autologue

  40 p.I00 de sérum de veau

  I0 p.I00 de liquide de Hanks

- 2ème milieu :

  90 p.I00 de sérum de veau

  I0 p.I00 de liquide de Hanks

- 3ème milieu :

  50 p.I00 de sérum de veau

  50 p.I00 de liquide de Hanks

Par ailleurs, nous avons essayé de vérifier si l'on pouvait déterminer une concentration optimale de sérum dans les milieux de culture. Dans ce but, nous avons utilisé les milieux suivants :

- milieu renfermant :

  60 p.I00 de sérum de veau

  et 40 p.I00 de liquide de Hanks

- milieu renfermant :

  80 p.I00 de sérum de veau

  et 20 p.I00 de liquide de Hanks

c) Concentration leucocytaire.

Des essais ont été conduits afin de déterminer la concentration optimale de leucocytes par ml. Après les deux lavages, le culot des leucocytes a été remis en suspension dans le milieu de culture de façon à obtenir les concentrations suivantes :

$2 \times I0^7$ leucocytes/ml.

$I,5 \times I0^7$ leucocytes/ml.

$I,3 \times I0^7$ leucocytes/ml.

$I \times I0^7$ leucocytes/ml.

Les numérations leucocytaires ont été effectuées, d'une part, sur le sang total, d'autre part, sur la suspension de leucocytes.

d) Influence du pH.

Des milieux de pH différents ont été employés afin de préciser le pH optimal. Initialement le milieu de fixation et le milieu dit de survie possédaient un pH respectivement de 7,I et de 7,2.

Par addition de bicarbonate de sodium, (5,6 p.IOO), on a porté les pH de ces deux milieux, pour le premier à 7,2 puis à 7,5, pour le second à 7,4, puis à 7,8.

Le milieu de fixation a été changé 24 h. après la mise en culture et remplacé par le milieu de survie.

Le milieu de survie était changé tous les 7 jours et remplacé par un milieu de même pH.

e) Stimulation des leucocytes par la phytohémagglutinine et le sérum antilymphocytaire.

La phytohémagglutinine employée est une substance commercialisée (Difco).

Le sérum antilymphocytaire de cheval a été préparé par injections répétées au mouton de lymphocytes prélevés dans le sang circulant. L'activité du sérum ainsi préparée a été titrée grâce au test de lymphoagglutination et au test de lymphocytotoxicité. Le titre du sérum antilymphocytaire employé était de I/IOO en lymphocytotoxicité.

6 expériences ont été réalisées dans les conditions qui sont résumées dans le tableau 4 . Dans la première expérience, le sérum antilymphocytaire a été ajouté à la concentration de I goutte pour I ml de suspension leucocytaire. Dans la seconde expérience, la phytohémagglutinine et le sérum antilymphocytaire ont été utilisés pendant un temps réduit à 24 h. Ils ont été introduits dans le milieu de survie aux concentrations suivantes :

- pour la phytohémagglutinine : 1 ml pour 5 ml de milieu ;
- pour le sérum antilymphocytaire : I goutte pour 5 ml.

Tableau 4 : TABLEAU RECAPITULATIF DES ESSAIS PORTANT SUR LA STIMULATION DES LEUCOCYTES PAR LE SERUM ANTILYMPHOCYTAIRE (SAL) ET PAR LA PHYTOHEMAGGLUTININE (PHA).

| Expérience | Sang | Milieu de Fixation (pendant 24 H) | Milieu de Survie |
|---|---|---|---|
| 1 | - | SAL | |
| 2 a<br>b | - | - | PHA/M pendant 24 H.<br>SAL |
| 3 a<br>b | - | - | PHA/M pendant 5 jours<br>SAL |
| 4 | - | PHA/M | |
| 5 a<br>b | - | PHA/M<br>SAL | PHA/P<br>SAL |
| 6 a<br>b | PHA/M<br>avant centrifugation | - | PHA/P<br>SAL |

Le milieu de survie a été changé 24 h. après et remplacé par du milieu normal dépourvu de phytohémagglutinine ou de sérum antilymphocytaire.

Le troisième essai a été conduit de façon identique mais en laissant agir la phytohémagglutinine et le sérum antilymphocytaire pendant 5 jours au lieu de 24 h.

Dans la quatrième expérience, on a employé la phytohémagglutinine M à la même dose, pendant les 24 h. de fixation en l'introduisant à raison de 0,I ml pour 5 ml de milieu de fixation.

Dans l'essai suivant la phytohémagglutinine et le sérum antilymphocytaire ont été introduits dans le milieu dès la phase de fixation et ont ensuite été renouvelés pendant toute la durée de survie des cellules.

Enfin dans le dernier essai, la phytohémagglutinine M a été employée pour aider la sédimentation des hématies et leur élimination par centrifugation. Après 24h. de culture on a ajouté de la phytohémagglutinine T à la même concentration que précédemment et dans d'autres tubes on a introduit du sérum antilymphocytaire.

f) Essai de trypsination des leucocytes.

Une culture de leucocytes a été préparée en flacons de 60 ml ; après 3 jours de culture on a trypsiné les leucocytes selon les mêmes modalités que pour les cultures de lignées cellulaires.

La digestion des leucocytes a été réalisée en introduisant 2 ml de trypsine à 25 p.I00 dans un flacon où elle est laissée pendant 25 à 35 secondes.

A l'issue de ce temps, la trypsine est rejetée et on laisse les flacons à la température du laboratoire pendant I0 à I2 minutes. Lorsque les leucocytes sont détachés de la paroi du verre, on introduit 6 ml de milieu neuf dans chaque flacon et par aspirations et refoulements répétés, on récupère les leucocytes isolés.

Après dédoublement du milieu, on répartit la suspension, d'une part dans un autre flacon de 60 ml (on y introduit 6 ml), d'autre part dans des tubes à lamelles qui permettront une coloration afin de contrôler l'état des cellules.

g) Culture de leucocytes de cheval au cours d'une crise d'Anémie Infectieuse.

La technique de mise en culture est identique à celle précédemment décrite. La vitesse de sédimentation des hématies est simplement plus rapide et les globules blancs moins nombreux que lors de l'emploi d'un sang provenant d'un cheval normal.

h) Appréciation de l'état des leucocytes.

L'état des leucocytes a été apprécié d'une part pour les cellules vivantes, d'autre part après fixation et coloration. Les tubes ronds et les tubes de Leighton contenant des leucocytes ont été examinés au microscope ordinaire à un grossissement de I00 ; on a utilisé également, pour juger de l'état des cellules, le microscope à optique inversée.

Deux techniques de coloration ont été retenues : la technique de May Grunwald Giemsa et la technique à l'hémalun éosine.

Technique de May Grunwald Giemsa :

Après avoir éliminé le milieu de culture, on lave les lamelles à l'eau physiologique deux fois afin d'éliminer tout le sérum contenu dans le milieu. On effectue alors la fixation à l'aide d'alcool méthylique pur pendant I0 à 30 mn. Les lamelles sont ensuite retirées des tubes et colorées à l'aide du May Grunwald pendant I0 mn. Après lavage à l'eau du robinet, on fait agir une solution de Giemsa rapide à raison de I ml pour I4 ml d'eau minérale pendant 20 mn. Après lavage à l'eau du robinet, on procède à une déshydratation progressive à l'aide de 3 bains d'acétone et de toluène composés de la façon suivante :

Ier bain :

90 p. I00 d'acétone

I0 p. I00 de toluène

Deuxième bain :

70 p. I00 d'acétone

30 p. I00 de toluène

Troisième bain :

30 p. I00 d'acétone
70 p. I00 de toluène

On place enfin les lamelles dans deux bains de toluène pur avant de les monter à l'aide de Baume du Canada.

Coloration à l'hémalun éosine.

Après avoir éliminé le surnageant, on lave trois fois les lamelles à l'eau physiologique. On introduit ensuite dans les tubes du liquide de BOUIN qu'on laisse agir pendant 2 à 24h.

On soumet ensuite la lamelle à l'action de l'alcool absolu pendant I à 2 mn, de l'alcool à 80° lithiné, de l'alcool à 80° et de l'eau distillée.

La coloration proprement dite comporte l'action de l'hémalun pendant 25 mn puis une différenciation rapide par l'alcool chlorhydrique à 0,25 p.IOO dans l'alcool à 70°. On place ensuite la lamelle dans l'eau jusqu'à l'apparition d'une coloration bleu foncé et on lave plusieurs fois à l'eau courante.

Le temps suivant consiste en l'action de l'éosine à 0,5 p.IOO pendant une minute, On lave de nouveau à l'eau avant d'effectuer une déshydratation progressive, en utilisant successivement l'alcool à 80°, l'alcool absolu et le toluène. Il reste à monter la lamelle, en posant une goutte de Baume du Canada sur une lame propre et dégraissée et en plaçant la lamelle sur cette goutte.

B. Résultats.

Les résultats seront indiqués en suivant le plan précédemment utilisé pour exposer les techniques de culture des leucocytes.

a) Mise en culture

La comparaison des techniques de KOBAYASHI, de LIVINGSTON et de DESCARPENTRIES a été en faveur de la technique de KOBAYASHI.

Il est nécessaire de changer le milieu 24 h. après la mise en culture et d'effectuer un lavage des cellules à l'aide de milieu neuf ou de solution de Hanks pour éliminer la totalité des hématies résiduelles et les leucocytes non fixés à la paroi de verre.

Il est également souhaitable de changer les milieux de culture tous les 8 à IO jours avec du milieu neuf.

Le milieu de Hanks a donné de meilleurs résultats que celui de Eagle ou que le milieu de Parker I99.

La représentation graphique de la sédimentation des globules rouges est très utile car elle permet d'intervenir au moment optimal. Des exemples de courbes obtenues avec le sang de différents chevaux sont portés dans le tableau 5 .

Pour la centrifugation des suspensions de leucocytes, la vitesse optimale a été de IOOO tours/mn pendant 9 mn à la température du laboratoire. Une vitesse supérieure entraine la formation d'amas leucocytaires qui subsistent ensuite dans les tubes de culture. Une vitesse inférieure n'élimine pas suffisamment les globules rouges. Enfin, il semble que la centrifugation à la température du laboratoire soit préférable à une centrifugation à +4°. En effet, cette dernière tend à diminuer la vitalité des leucocytes.

Un délai de 24 h. suffit pour assurer la fixation des cellules.

En respectant ces différentes modalités, on obtient une fixation de cellules mononucléaires, tandis que les polynucléaires et les lymphocytes qui se trouvent présents en certaine quantité sur la lamelle au cours des premières 24h. sont ensuite éliminés après le lavage et le changement de milieu. L'aspect obtenu au bout de 24 h. de culture est le suivant : on peut distinguer, d'une part un ensemble de cellules agglomérées constituées par des polynucléaires, d'autre part quelques hématies et enfin des cellules d'allure monocytaire à

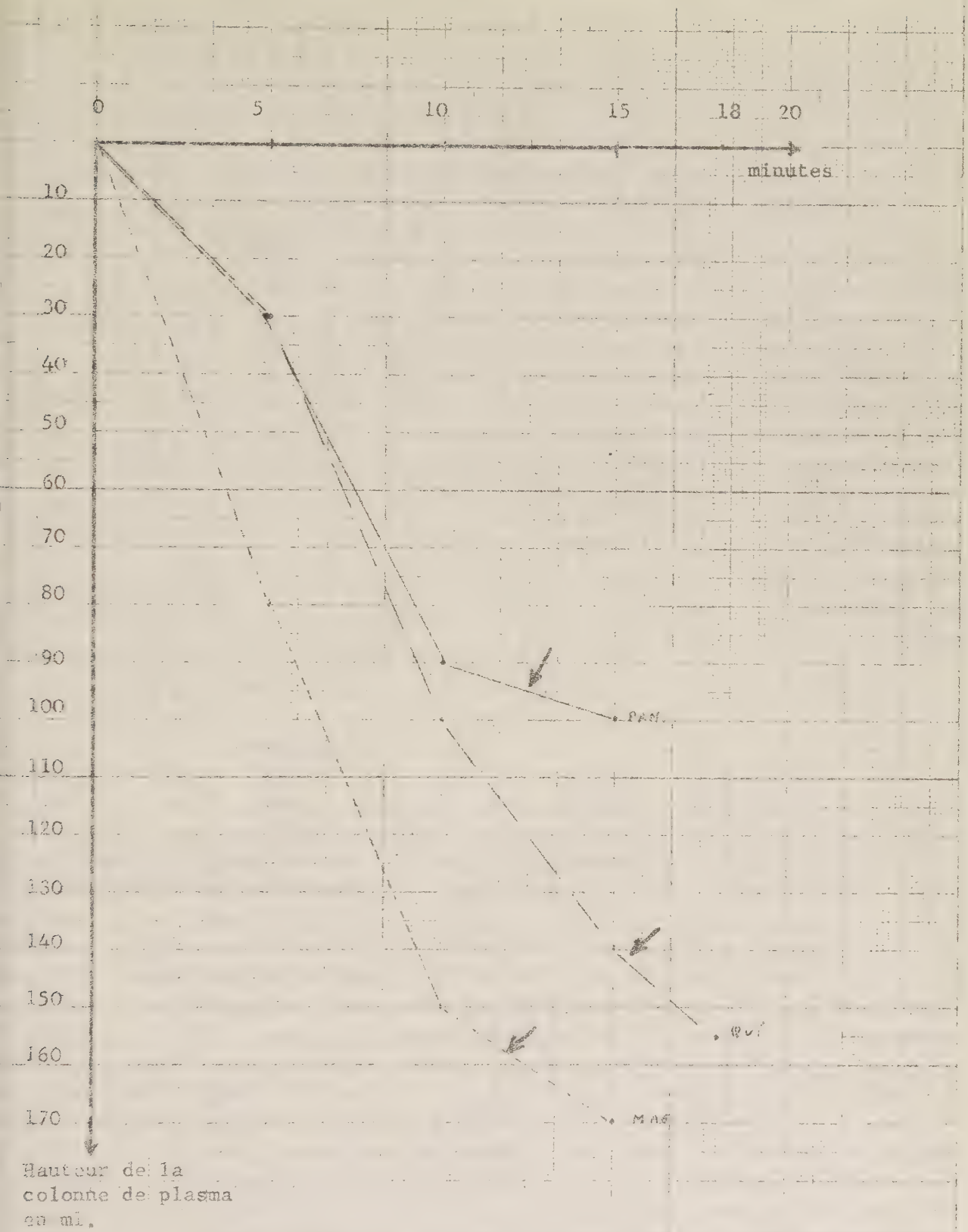



Tableau 5 : Représentation graphique de la sédimentation sanguine (éprouvette de 500 ml)
La flèche représente le moment du prélèvement.

à noyau large, clair et à cytoplasme bien étalé. Dès ce moment, on peut observer des syncytiums constitués par une très large cellule contenant IO noyaux ou même davantage. Il semble qu'il s'agisse effectivement de syncytiums, c'est-à-dire de cellules polynucléées résultant de réunions de cellules voisines les unes des autres et non pas de divisions nucléaires survenant dans une même cellule, car l'apparition de ces cellules géantes est sans doute très rapide et n'avons pas eu l'occasion, à ce stade, d'observer de mitoses dans les cellules. Ultérieurement, seules restent fixées ces cellules d'allure histio-monocytaire, à noyau très large (cliché 1) comprenant un ou plusieurs nucléoles et à cytoplasme bien étalé ; ces cellules peuvent persister pendant un temps très long, comme nous l'envisagerons plus loin.

Le cliché 3 montre l'aspect très fréquemment présenté par ces vastes syncytiums, plus ou moins nombreux selon le cheval ayant fourni les leucocytes et selon les conditions de culture. On peut y déceler parfois plusieurs dizaines de noyaux très clairs bien étalés et disposés souvent en couronne, au centre d'un cytoplasme, lui-même étalé.

b) Milieux utilisés

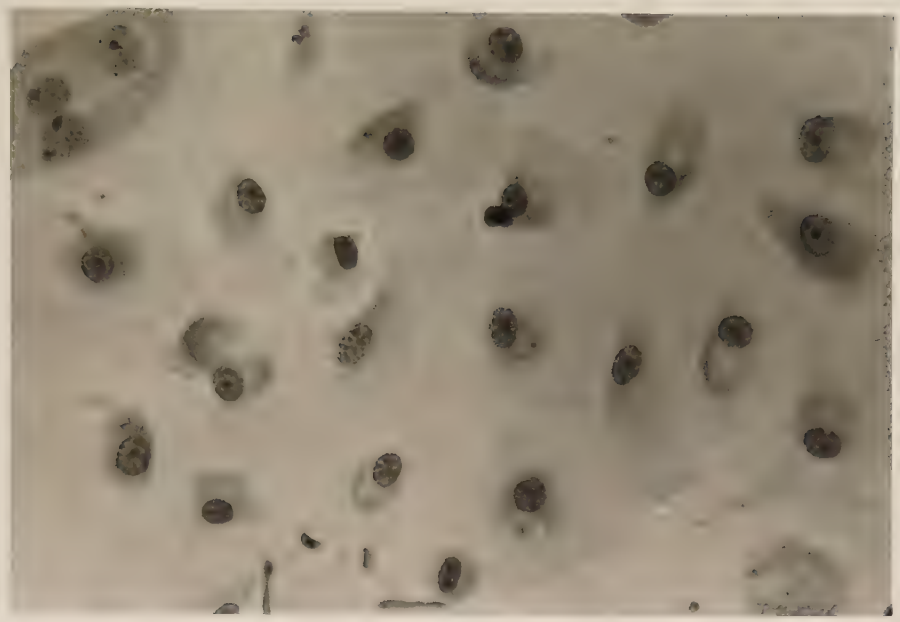
L'étude de différents milieux contenant diverses concentrations de sérum de veau ou de plasma d'un même cheval, permet d'arriver aux conclusions suivantes :

1) L'emploi du plasma provenant du cheval qui a fourni les leucocytes ne donne pas de meilleurs résultats que l'utilisation du sérum de veau

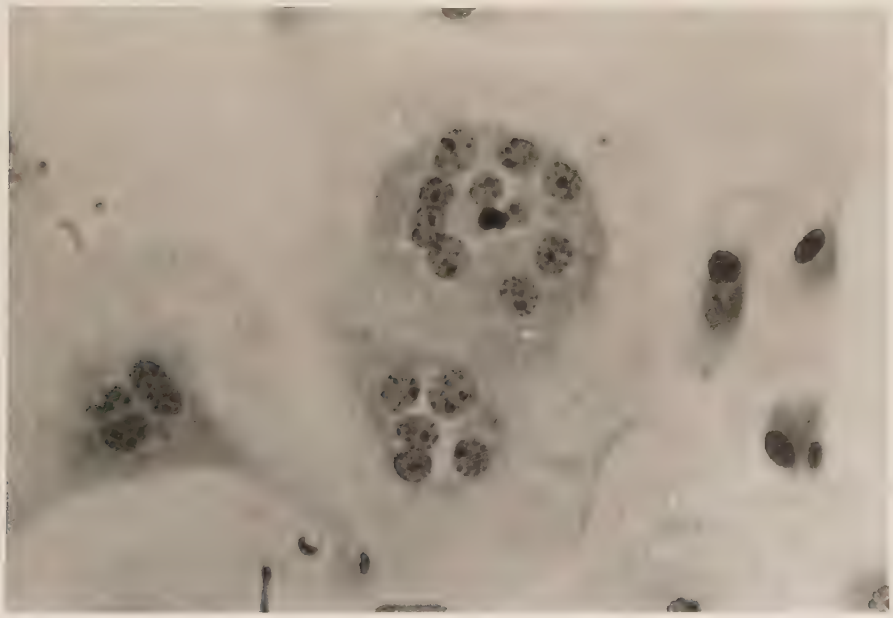
2) Pour la fixation des leucocytes, une concentration relativement faible de sérum de veau semble préférable. Il est donc souhaitable d'employer pendant les 24 premières heures, le milieu dit "de fixation" pour lequel, la concentration en sérum de veau n'est que de 60 p. IOO.

3) Pour la survie des leucocytes de cheval, au contraire, il est préférable d'employer une concentration élevée en sérum. Dans le milieu dit "milieu de survie", cette concentration est de 80 p. IOO.

La modalité optimale d'emploi de milieu de culture semble donc être successivement un milieu dit de fixation contenant 60 p. IOO



CLICHE 1 : Tapis de cellules d'aspect histiomonocytaire.



CLICHE 2 : Exemple de syncitium.

de sérum de veau et 40 p. 100 de liquide de Hanks, puis le milieu de survie, plus riche en sérum (80 p. 100) ; c'est cette technique qui nous a donné les meilleurs résultats.

Nous n'avons pas observé de différence lors de l'emploi de sérum décomplémenté et filtré ou non filtré. Il ne semble donc pas que la filtration puisse intervenir de façon défavorable comme l'avait fait remarquer WATANABE (104).

Enfin le milieu de Hanks nous a donné de meilleurs résultats que celui de Parker ou Eagle.

c) Concentration leucocytaire

Les meilleurs résultats ont été obtenus avec une suspension de leucocytes contenant de $1,3 \times 10^7$ à $1,5 \times 10^7$ leucocytes/ml. Lorsque la suspension de leucocytes est plus concentrée, on obtient des amas leucocytaires, tandis que lorsqu'elle est à une concentration inférieure, les cellules sont éloignées les unes des autres et ne forment pas un tapis leucocytaire permettant d'envisager les modifications des cellules.

d) Influence du pH

Les meilleurs résultats ont été obtenus avec des milieux de culture à pH 7,1 pour le milieu dit de fixation et 7,2 pour le milieu dit de survie.

En effet, le pH de 7,8 entraine un détachement et une destruction rapide des cellules. Le milieu à pH 7,4 ne permet pas une survie très longue des cellules. Les noyaux se condensent et prennent un aspect pycnotique.

e) Influence du cheval donneur de cellules

Nous avons constaté de très grandes variations d'un animal à l'autre dans l'aptitude à donner des leucocytes à survie très longue. Nous confirmons en cela les travaux d'un auteur japonais précédemment cité.

Certains chevaux donnent régulièrement des leucocytes capables de survivre très longtemps. Nous avons obtenu des survies de leucocytes pendant plus de 40 jours avec le cheval "Pam". La plupart des chevaux permettent d'obtenir des syncytiums constitués de grandes cellules contenant plusieurs noyaux clairs et bien étalés.

Par contre, d'autres chevaux, en particulier "Bob", "Ore", "Ult", ont fourni des leucocytes incapables d'une longue survie et qui se détachaient de la paroi de verre au bout de quelques jours seulement. Les résultats comparés obtenus avec quelques chevaux sont portés dans le tableau 6 .

Dans ces conditions, nous avons sélectionné parmi les 15 chevaux utilisés, l'un d'entre eux qui donne régulièrement d'excellentes cultures de leucocytes; il s'agit du cheval "Pam" âgé de 9 ans, mâle de race Barbe. Pour les passages en série du virus de l'Anémie Infectieuse, nous avons été amenés à plusieurs reprises à employer le sang d'autres chevaux qui s'étaient révélés être de bons donneurs comme le cheval "Mag" ou "Qui".

f) <u>Stimulation des leucocytes de cheval en culture par la phytohémagglutinine et le sérum antilymphocytaire.</u>

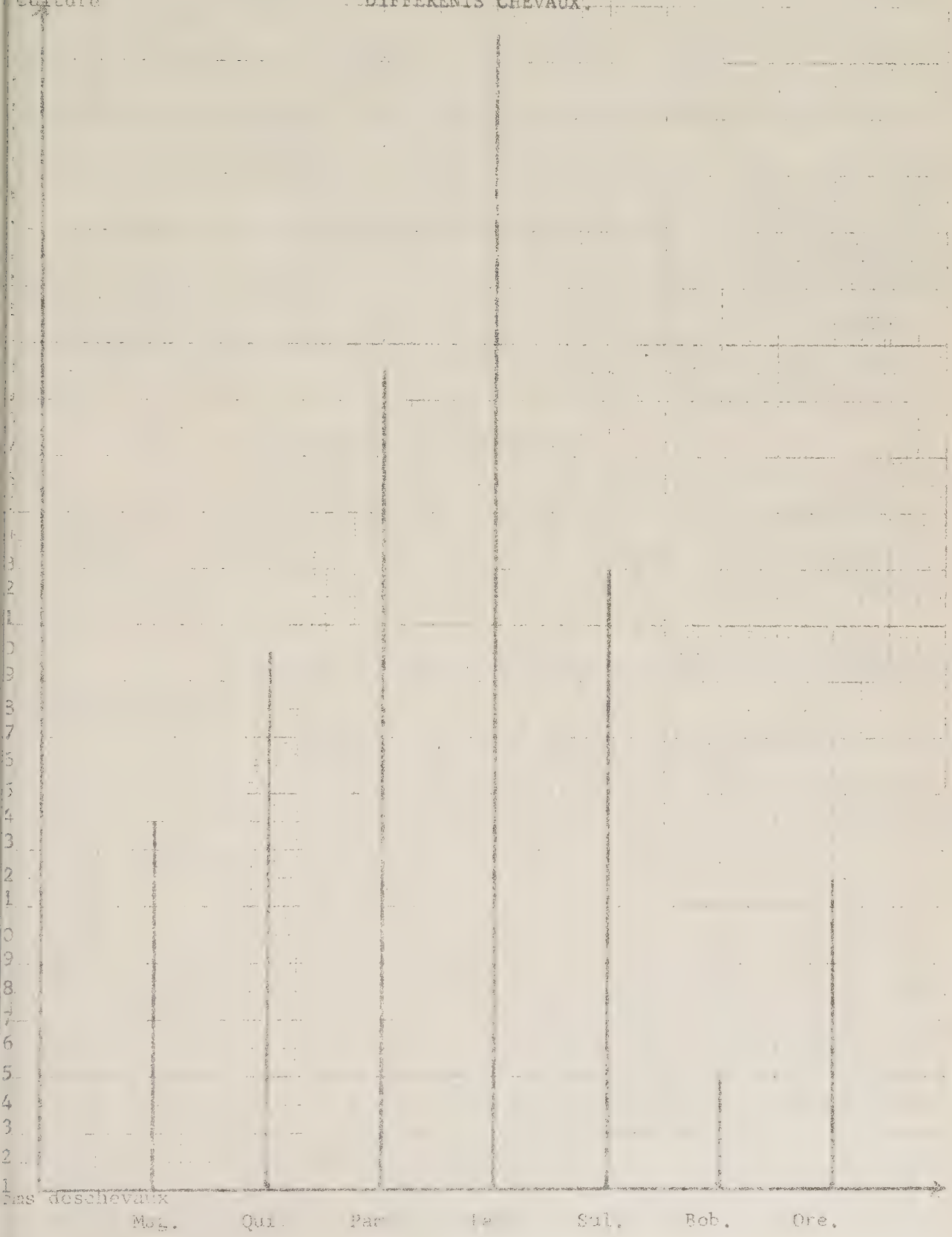
Lors du premier essai, la concentration en sérum antilymphocytaire était trop élevée et a entrainé un effet toxique pour les cellules. Celles-ci ne se sont pas fixées correctement sur la lamelle.

Lors du deuxième essai, c'est-à-dire l'emploi du sérum antilymphocytaire et de phytohémagglutinine pendant 24h. sur des cellules déjà fixées, nous avons observé des mitoses, alors que ces dernières faisaient défaut dans les cellules témoins.

Lors du troisième essai, c'est-à-dire de l'emploi du sérum antilymphocytaire et de phytohémagglutinine pendant 5 jours sur des leucocytes déjà fixés, les résultats diffèrent avec la substance employée. En effet, avec le sérum antilymphocytaire, les noyaux deviennent pycnotiques et les cellules ont tendance à se détacher du verre. Au contraire, avec la phytohémagglutinine, on observe de nombreuses mitoses dans les cellules.

Lors de la quatrième expérience, l'emploi de la phytohémagglutinine pendant le temps de fixation a conduit à des résultats défavorables. En effet, les globules rouges se sont fixés sur la paroi des tubes en grand nombre et par ailleurs, les leucocytes formaient des agrégats.

Tableau 6 : SURVIE DES LEUCOCYTES PROVENANT DE DIFFERENTS CHEVAUX.



Enfin, les deux derniers essais ont abouti également à des résultats moins favorables qu'en l'absence de substances stimulantes. En effet, on constate des globules rouges qui semblent être fixés sur la paroi des tubes et qui sont réunis en petits amas. Il y a par contre moins de leucocytes fixés sur le verre. Le cytoplasme et le noyau des cellules montrent des images traduisant la souffrance des cellules. Enfin, on observe des mitoses.

Ces différents moyens de stimulation des lymphocytes par phytohémagglutinine et sérum antilymphocytaire n'ont donc pas conduit à une amélioration de la technique de culture des leucocytes. Au contraire, les résultats obtenus sont en général moins bons que lors de la mise en culture normale. Dans ces conditions, nous n'avons pas continué l'étude de l'emploi de ces substances étant donné que la technique standard fournissait d'excellents résultats.

g) Trypsination des leucocytes.

Les essais de trypsination de culture de leucocytes se sont soldés par un échec. En effet, les cellules ne se sont pas multipliées suffisamment pour pouvoir donner un tapis. Après trypsination et ensemencement de nouveaux flacons, les cellules se fixent mal puis se détachent rapidement.

h) Culture des leucocytes de cheval au cours d'une crise d'Anémie Infectieuse.

Pendant les premiers jours, la culture paraît correcte, en particulier avec de nombreux syncytiums et des cellules à noyaux larges et clairs. Mais au bout de quelques jours, les cellules se détachent spontanément et le tapis disparaît.

i) Culture de leucocytes à 30°.

En vue d'obtenir éventuellement une multiplication du virus de l'Anémie Infectieuse à basse température (30°) nous avons placé des cultures de leucocytes de cheval à cette température. Parallèlement, des leucocytes traités dans les mêmes conditions étaient incubés à 37°. Nous avons obtenu dans ces conditions une survie de leucocytes un peu inférieure lorsqu'ils sont placés à 30° par rapport à ceux placés à 37°. Cependant les délais de survie des leucocytes sont compatibles avec le temps nécessaire au virus de l'anémie infectieuse pour entrainer un effet cytopathogène et une destruction totale des leucocytes.

C. Discussion.

Nous avons essayé de déterminer les conditions optimales de lture des leucocytes de cheval. Pour la suite de notre travail, il était effet indispensable de conserver des leucocytes vivants, le plus longtemps ssible. Certaines de nos cultures ont atteint 40 jours de survie.

Comme KOBAYASHI ( 54 ), nous avons montré la nécessité d'une forte se de sérum de veau dans le liquide de culture. Les meilleurs résultats sont tenus avec une concentration de sérum de veau de 80 p.IOO.

La concentration leucocytaire qui nous a donné les meilleurs ré- ltats et qui suffit pour la formation d'un tapis leucocytaire complet, est I,3 x $IO^7$ leucocytes par ml ; cette concentration est donc inférieure à lle préconisée par KOBAYASHI ( 54 ) qui emploie une quantité de 2 x $IO^7$ llules par ml.

Comme KOBAYASHI ( 54 ) et WATANABE ( 104) nous avons observé de andes variations, parmi les chevaux utilisés, dans l'aptitude des sujets à nner des leucocytes de longue survie. Par suite, nous avons utilisé surtout un d'entre eux et éventuellement un second cheval.

L'emploi successif de deux milieux de culture différant légèrement tre eux par la concentration en sérum de veau, nous a donné les meilleurs sultats. Le premier, dit milieu de fixation, ne renferme que 60 p.IOO de rum de veau, tandis que le second, dit milieu de survie, a une concentration 80 p. IOO en sérum de veau.

KOBAYASHI et KOKO ( 53 ) recommandent de renouveler le milieu h. après la mise en culture. Cette manipulation nous est apparue indispen- ble pour éliminer les hématies et les polynucléaires éventuellement présents ns stade de la culture dans les tubes. Ultérieurement un changement de mi- eu tous les 6 à IO jours suffit.

Pour la sédimentation du sang, le dextran et la phytohémagglutinine nt inutiles. En effet, la sédimentation du sang de cheval est suffisamment pide et facile pour que l'on puisse se dispenser de ces substances alors u'elles demeurent nécessaires pour le sang d'autres espèces animales, en par- ulier celui des bovins. Cependant la représentation graphique de la sédi- ntation sanguine reste indispensable pour apprécier le moment optimal de élèvement du plasma. On constate en effet, des variations périodiques de ette vitesse aussi bien entre divers chevaux que pour un même cheval.

Comme l'ont montré HAAG et LARENAUDIE ( 36 ), si l'on tarde à recueillir la suspension de leucocytes, on obtient un volume plus grand de plasma, mais une concentration plus faible de cellules blanches. Des numérations leucocytaires effectuées d'une part sur le sang total, d'autre part sur le plasma prélevé au moment optimal montrent que la concentration du plasma en leucocytes est en général nettement supérieure à celle du sang total.

Comme KOBAYASHI ( 54 ), nous n'avons eu que des résultats médiocres ou franchement mauvais en employant comme sérum celui du cheval ou bien le plasma du cheval ayant fourni les leucocytes.

Par contre, nous n'avons pas pu confirmer la notion avancée par WATANABE ( 104 ), à savoir que le sérum de veau filtré fournit de moins bons résultats que le sérum de veau normal. En effet, après chauffage pour décomplémenter le sérum et après filtration sur filtre Seitz, nous obtenons les mêmes résultats que lors de l'emploi du sérum simplement chauffé.

Les leucocytes de cheval se sont révélés fort sensibles aux variations de pH. Nous avons constaté que le pH obtenu en préparant normalement un milieu de culture, sans addition de bicarbonate de sodium supplémentaire, convient parfaitement.

Nos essais de stimulation des leucocytes par la phytohémagglutinine et par le sérum antilymphocytaire ne nous ont conduit qu'à des résultats médiocres, voire franchement défavorables. Dans ces conditions, et compte tenu des excellents résultats enregistrés suite à l'emploi de la technique normale, nous n'avons pas poursuivi l'étude de l'utilisation de ces deux substances.

Les essais de trypsination se sont soldés par des échecs. Il est permis de penser qu'en s'adressant à des animaux très jeunes, voire à du sang de foetus, la trypsination permettrait de réaliser quelques subcultures.

Résumé des principales modalités de la technique retenue.

Prélèvement du sang sur héparine (40 U. héparine par ml de sang)

Sédimentation du sang dans une éprouvette inclinée à 45° et laissée à la température du laboratoire. Représentation graphique de l'évolution de la sédimentation et prélèvement du plasma lors du ralentissement de la vitesse de sédimentation.

Mesure du volume du plasma et numération des globules blancs.

Centrifugation du plasma à IOOO tours/minute pendant 9 mn.

Lavage du culot de centrifugation avec du liquide de Hanks.

Remise en suspension soigneuse du culot leucocytaire dans une petite quantité de liquide de Hanks.

Addition de milieu de culture de façon à obtenir une concentration de I3 millions de leucocytes/ml, dans un milieu contenant :

- 60 p. IOO de sérum de veau
- 40 p. IOO de liquide de Hanks
- 200 U.I. de pénicilline /ml.
- IOO µg de streptomycine/ml.

Distribution de la suspension des leucocytes agitée en permanence, dans les tubes ou les flacons de culture.

Changement de milieu 24 h. après un séjour à 37°. Les cellules sont rincées deux fois avec du liquide de Hanks puis le milieu définitif contenant 80 p.IOO de sérum de veau est introduit dans les tubes. Incubation à 37°.

Changement de milieu tous les 8 à IO jours.

## II. Etude du virus de l'anémie infectieuse inoculé aux cultures de leucocytes de cheval.

Le premier temps de notre étude consistait en la recherche des meilleures conditions de culture de leucocytes de cheval. En possession d'une technique assurant des résultats régulièrement favorables, nous avons pu inoculer le virus à ces cellules et essayer de préciser un certain nombre de propriétés du virus de l'anémie infectieuse, virus qui, nous l'avons vu dans la première partie de ce travail, est encore à l'heure actuelle extrêmement mal connu.

Notre étude a porté sur les points suivants :

En premier lieu, nous avons recherché l'apparition d'un effet cytopathogène, après inoculation de virus à différents types de cellules, notamment de leucocytes de cheval. L'effet cytopathogène a été observé sur des cellules vivantes, sur des cellules fixées et colorées, enfin au microscope électronique.

Des passages en série de différentes souches de virus de l'anémie infectieuse ont été réalisés sur des leucocytes de cheval. Après un certain nombre de passages en série, la preuve de la replication a été apportée par inoculation en retour au cheval.

Des systèmes cellulaires différents, d'obtention plus facile que la culture de leucocytes de cheval, ont été soumis à l'inoculation de plusieurs souches de virus de l'anémie infectieuse afin de déceler une éventuelle sensibilité d'autres cellules à ce virus.

Enfin, d'autres techniques ont été appliquées, notamment en vue d'obtenir éventuellement des plages sur les cellules après inoculation des virus, afin de préciser la taille du virus par des opérations de filtration, et enfin pour essayer de déterminer la nature de l'acide nucléique viral grâce à l'emploi de substances comme la 5-iodo 2 desoxyuridine et l'acridine orange.

L'ensemble de ce travail sera exposé en passant successivement en revue le matériel employé, les techniques, les résultats constatés et sera suivi d'une discussion portant sur l'intérêt de ces recherches.

A. Matériel.

Le matériel utilisé au cours de cette étude consiste en souches virales, en systèmes cellulaires, en différents milieux de culture et produits de laboratoire et enfin en chevaux.

1) Souches virales.

Trois souches françaises de virus de l'anémie infectieuse du cheval isolées à l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort dans le service des maladies contagieuses ont été employées. Le matériel de départ était représenté par le sérum de chevaux atteints d'anémie infectieuse, prélevé au cours d'une crise.

Ces trois souches sont les suivantes :

- "Vitastérone" (sérum prélevé le 4 mars 1968)
- "Vent des Prairies" (sérum prélevé le 2 Février 1967)
- "Blanchette" (sérum prélevé le 28 août 1968).

Une souche américaine due à l'obligeance du docteur MOTT [x] a également été utilisée. Il s'agit de la souche "Wyoming" provenant de Agricultural Research Service, National Animal Disease Laboratory, AMES, et consistant, d'une part, en sérum lyophilisé (le 1er septembre 1947) et, d'autre part, en sérum frais de cheval (n°47) prélevé le 15 novembre 1968 .

2) Systèmes cellulaires.

Nous avons employé les systèmes cellulaires suivants :

Culture de leucocytes de cheval (cf. 1ère partie des recherches personnelles).

Cellules NIL expédiées au laboratoire du Professeur GORET par le Docteur DIAMOND [xx] du Wistar Institute à PHILADELPHIE.

Cellules KB provenant de l'Institut Pasteur, Paris.

Cellules de rein de singe, de même provenance.

Cellules PK 15 (cellules rénales de porc) fournies gracieusement par Madame le Docteur MORAILLON, du service de Médecine de l'Ecole Vétérinaire d'Alfort.

---

x Nous adressons nos bien vifs remerciements au Docteur MOTT qui a bien voulu nous fournir la souche Wyoming de virus de l'anémie infectieuse.

xx Nous exprimons également nos bien vifs remerciements au Docteur DIAMOND qui a bien voulu expédier la souche du Wistar Institute au laboratoire du Pr. GORET.

3) Milieux de culture.

Les principales substances ayant servi à la préparation des milieux pour ces systèmes cellulaires sont les suivantes :

- sérum de veau (Institut Mérieux)
- sérum de cheval (Institut Pasteur, Paris)
- Liquide de Hanks (Institut Pasteur, Paris)
- Milieu de Eagle (Institut Mérieux, Lyon)
- Milieu de Parker I99 (Institut Mérieux, Lyon)
- Trypsine (Institut Mérieux, Lyon)
- Pénicilline et streptomycine (Specia, Paris).

4) Produits de laboratoire.

Les principaux produits suivants ont été utilisés :

- 5 iodo 2 desoxyuridine (Laboratoire Chauvin-Blache[x])
- thymidine (Merck)
- héparine (Roche)
- gélose (Difco)
- acridine orange (fourni gracieusement par Monsieur le Docteur FAVE de l'Ecole Vétérinaire d'Alfort)
- filtres millipore de 200 mμ , I00 mμ , et 50 mμ .
- gomme adragante (Prolabo).

5) Chevaux.

En plus des chevaux qui ont fourni leur sang pour la culture des leucocytes (cf. Ière partie des recherches personnelles), deux autres animaux ont reçu des inoculations de matériel virulent. Il s'agit du cheval nommé "Wyoming" qui a reçu l'injection de sérum lyophilisé le Ier septembre I947 (souche Wyoming) et du cheval baptisé "Leucocyte" qui a reçu une injection de surnageant d'une culture du virus de l'anémie infectieuse, en leucocytes.

---

x Nous exprimons nos remerciements au Laboratoire Chauvin-Blache qui nous a fourni gracieusement cette substance.

6) Microscope électronique.

L'étude au microscope électronique des cultures de leucocytes infectées par des souches du virus de l'anémie infectieuse, a été réalisée par le Docteur BERNHARD, dans le service du Professeur TOURNIER, à l'hôpital Gustave Roussy (Villejuif).

B. Techniques.

1) Inoculation aux cultures de leucocytes.

La culture de leucocytes est préparée comme il a été indiqué précédemment. Après changement de milieu le lendemain de la mise en culture, les cellules sont prêtes pour l'inoculation.

L'examen des tubes ou des flacons de culture au microscope à optique inversée permet de vérifier que le tapis leucocytaire est complet. On utilise des leucocytes âgés de 2 à 5 jours.

L'inoculum est introduit dans les tubes à raison de 0,5 ml par tube. Il est laissé pendant 1 heure à la température du laboratoire. A l'issue de ce temps, on complète à 2 ml le contenu des tubes à l'aide de milieu de survie. Les tubes sont ensuite portés à 37° et le lendemain le milieu est changé.

Parallèlement une série de tubes témoins est préparée, puis reçoit soit du sérum de cheval sain lorsque les tubes infectés par le virus ont reçu du sérum de cheval atteint d'anémie infectieuse, soit du surnageant d'une culture précédente en leucocytes, lorsque les tubes infectés par le virus ont reçu eux-mêmes le surnageant d'une culture de leucocytes.

Lorsque l'effet cytopathogène est déjà manifeste dans les tubes et que presque toutes les cellules se sont détachées, on congèle et décongèle 3 fois le contenu des tubes en les portant successivement au bain marie à 37° et dans de la neige carbonique.

Le milieu est alors centrifugé à 8000 ou 9000 tours/mn pour éliminer les particules cellulaires et le surnageant est utilisé pour le passage suivant. Les tubes témoins subissent exactement le même traitement.

Lorsque plusieurs jours s'écoulent entre la congélation et l'utilisation pour le passage suivant, les surnageants sont conservés à -30°.

2) Emploi d'autres systèmes cellulaires.

A part les leucocytes de cheval, quatre autres systèmes cellulaires ont été utilisés pour étudier un éventuel effet cytopathogène du virus de l'anémie infectieuse et rechercher la sensibilité d'autres types cellulaires à ce virus.

a) Cellules PK I5 (cellules rénales de porc)

Le milieu employé pour la culture de cette lignée cellulaire est du milieu de Eagle additionné de 2 p.I00 de sérum de veau. Les cellules ont été cultivées en tubes à lamelles. Deux séries de tubes ont été employées : les tubes de la première série ont reçu 0,25 ml du surnageant du 5ème passage de la souche "Vitastérone". Les autres tubes ont reçu la même quantité de surnageant de culture de leucocytes normaux. L'inoculum est laissé au contact des cellules pendant une demi-heure, puis on complète le milieu à 2,5 ml à l'aide du milieu cité ci-dessus.

Chaque jour, la lamelle d'un tube de chacune des deux séries, est prélevée, fixée et colorée à l'hémalun éosine afin d'observer l'état des cellules et l'éventuel effet cytopathogène.

b) Cellules KB.

Le comportement des cellules KB infectées par le virus de l'anémie infectieuse, a été suivi de deux façons différentes : d'une part en flacons de pharmacie, d'autre part en tubes à lamelles.

Pour la première technique, deux flacons ont été employés. Les cellules du premier flacon ont été inoculées avec le surnageant du 6ème passage de la souche "Vitastérone" en culture de leucocytes de cheval. L'inoculum est laissé au contact des cellules pendant I heure à la température du laboratoire, puis on ajoute I7 ml de milieu de culture pour cellules KB, à savoir hydrolysat de caséine contenant 3 p.I00 de sérum de veau. Le lendemain, le milieu est changé.

L'autre flacon a reçu le surnageant d'une culture de leucocytes de cheval sain.

L'état des cellules est observé quotidiennement au microscope à optique inversée.

Quatre jours après l'inoculation, les cellules des deux flacons sont trypsinées et réparties pour chacun d'entre eux dans de nouveaux flacons. Les cellules sont observées chaque jour au microscope.

Trois jours après la dernière trypsination, une nouvelle trypsination est effectuée.

Pour la seconde technique, deux séries de tubes à lamelles contenant des cellules KB ont été employées. Les tubes de la première série ont reçu 0,7 ml de surnageant d'une culture du 6ème passage en leucocytes de cheval de la souche "Vitastérone". Après une heure de contact à la température du laboratoire, on a ajouté I,3 ml de milieu de culture et le milieu a été changé 24h. après l'inoculation.

Les tubes de l'autre série ont été traités de la même façon, avec du surnageant d'une culture de leucocytes normaux.

L'état des cellules a été observé quotidiennement par fixation et coloration d'une lamelle provenant de chaque série par la technique à l'hémalun éosine.

c) Cellules rénales de singe.

Les cellules rénales de singe de première explantation ont été cultivées en milieu composé de liquide de Hanks et d'hydrolysat de caséine. Deux séries de tubes à essais ont été employées. Les cellules des tubes de la première série ont reçu 0,3 ml de surnageant d'une culture de la souche "Vitastérone" à son sixième passage sur leucocytes de cheval. Après contact pendant une heure à la température du laboratoire, 0,7 ml de milieu sont ajoutés dans les tubes. Le milieu est changé le lendemain.

Les tubes de l'autre série ont reçu du surnageant d'une culture de leucocytes témoins.

Les tubes des deux séries sont observés quotidiennement au microscope à optique inversée, pendant les I5 jours qui suivent l'inoculation.

d) Cellules NIL.

Comme pour les cellules précédentes, deux séries de tubes contenant des cellules rénales de hamster ont été employées. Les cellules de la première série de tubes ont reçu du surnageant de la souche"Vent des Prairies" à son 8ème passage en culture de leucocytes de cheval. La technique est identique à celle précédemment décrite, à la différence près que le milieu employé est du milieu de Eagle contenant IO p.IOO de sérum de veau.

Après inoculation, les cellules de chacune des deux séries sont fixées et colorées à l'hémalun éosine pour une étude de leur état.

3) Titrage du virus en culture de leucocytes.

Le surnageant du 3ème passage de la souche "Vitastérone" en culture de leucocytes de cheval a été titré sur ces mêmes cellules.

Les leucocytes étaient cultivés dans des tubes ronds de I6 x I60 contenant I,5 ml d'une suspension cellulaire.

Les différents tubes ont reçu 0,5 ml d'inoculum laissé en contact avec les cellules pendant une heure à la température du laboratoire. Après ce laps de temps, I ml. de milieu de culture a été ajouté aux tubes, puis le milieu a été changé après 24 h. à 37°.

Les tubes de la série témoin ont reçu du surnageant d'une culture de leucocytes normaux. Les tubes des autres séries ont reçu des dilutions du surnageant du 3ème passage de la souche "Vitastérone" en culture de leucocytes allant de $I0^{-1}$ à $I0^{-7}$ ; les dilutions étaient préparées dans du milieu de culture contenant 80 p.I00 de sérum de veau et 20 p.I00 de liquide de Hanks.

L'état des cellules a été noté quotidiennement pendant les I4 jours suivant l'inoculation du virus aux leucocytes.

4) Culture de leucocytes sous couche de gélose.

Les tapis de leucocytes cultivés en flacons ont été recouverts par un milieu de culture solide (à la gélose) ou semi-solide (gomme adragante).

La formule des milieux utilisés est la suivante :

- milieu gélosé : mélange à parties égales de :
  gélose Difco au rouge de phénol et de pH 7,2
  et de milieu de Hanks contenant 80 p.I00 de sérum deveau.
- milieu à la gomme adragante ( 109 ) : mélange à parties égales de :
  gomme adragante en solution à I,6 p.I00 dans l'eau distillée
  et de milieu de Hanks contenant 80 p. I00 de sérum de veau.

Pour le milieu gélosé, on introduit 20 ml. de milieu à la surface des leucocytes dans un flacon de 200 ml. On ajoute après solidification IO ml. de gélose (sans milieu de culture) pour rendre plus solide le milieu. On retourne alors les flacons et on les dépose à l'étuve.

Pour le milieu à la gomme adragante qui ne se solidifie pas, on laisse les flacons en position normale. Après 8 jours, la couche de milieu est éliminée et les cellules sont colorées par le bleu trypan.

5) Filtration.

Le surnageant de culture du virus de l'anémie infectieuse en culture de leucocytes de cheval a été filtré sur des filtres millipore dont le diamètre était de 220 mμ , IOO mμ et 50 mμ .

Le filtrat est ensuite inoculé à la culture de leucocytes de cheval. Les tubes des différentes séries ont reçu 0,7 ml de filtrat qui est laissé au contact avec les cellules pendant I h. à la température du laboratoire. A l'issue de ce temps, le milieu est complété jusqu'à 2 ml à l'aide du milieu de culture classique. Le milieu est changé au bout de 24h. L'état des cellules est ensuite suivi quotidiennement pendant I5 jours.

6) Emploi de la 5 iodo 2 desoxyuridine.

Afin d'essayer de déterminer la nature de l'acide nucléique du virus on a employé la technique à la 5 iodo 2 desoxyuridine.

On sait en effet que les virus à ADN ont leur culture inhibée en présence de cette substance, alors que les virus à ARN peuvent se développer normalement. La thymidine a la propriété de supprimer l'action inhibitrice de la 5 iodo 2 desoxyuridine sur la replication des virus à ADN.

Des tubes ronds contenant des cultures de leucocytes de cheval ont reçu les éléments suivants :

- tubes de la première série : milieu contenant uniquement de la 5 iodo 2 desoxyuridine.
- tubes de la seconde série : milieu contenant uniquement

la thymidine.

- tubes de la troisième série : milieu contenant de la 5 iodo 2 desoxyuridine et de la thymidine.

- tubes de la quatrième série : milieu contenant de la 5 iodo 2 desoxyuridine et inoculation par le virus de l'anémie infectieuse.

- tubes de la cinquième série : milieu contenant de la 5 iodo 2 desoxyuridine, de la thymidine et inoculation du virus de l'anémie infectieuse.

- tubes de la sixième série : milieu de culture normal et inoculation du virus de l'anémie infectieuse.

- tubes de la septième série : surnageant d'une culture de leucocytes normaux.

Les différents milieux décrits précédemment sont introduits dans les tubes 24h. avant l'inoculation du virus. L'inoculation est effectuée par introduction de 0,7 ml de surnageant de culture de leucocytes infectés et mise en contact pendant 1 h. à la température du laboratoire. A l'issue de ce temps, le milieu est complété à 2 ml.

Les concentrations employées pour la 5 iodo 2 desoxyuridine et la thymidine ont été respectivement de 40 µg/ml et de 80 µg/ml.

Le milieu est changé 24h. après l'inoculation, puis les cellules sont observées quotidiennement pendant 15 jours au microscope à optique inversée.

Les mêmes substances aux mêmes concentrations ont été introduites dans le système cellules PK - virus de la rhino-pneumonie équine afin de vérifier l'inhibition de la replication d'un virus à ADN en présence de 5 iodo 2 desoxyuridine.

7) Emploi de l'acridine orange.

Dans la même optique que précédemment, c'est-à-dire pour essayer de déterminer la nature de l'acide nucléique viral, on a coloré par l'acridine orange des cultures de leucocytes de cheval ayant reçu du virus de l'anémie infectieuse (5ème passage de la souche "Vitastérone") et des cultures de leucocytes témoins. Cette substance donne en effet une fluorescence rougeâtre en présence d'ARN monocaténaire et une fluorescence verdâtre en présence d'ADN.

La technique est la suivante : les tubes à lamelles sont vidés de leur contenu et rincés deux fois à l'aide de tampon phosphate. La fixation des cellules est assurée par l'action de l'alcool absolu pendant 5 mn. Ce dernier est remplacé par de l'alcool à 70° et l'on peut ensuite conserver à +4° pendant plusieurs jours les lamelles dans cette substance.

Lors de la coloration, la lamelle est sortie du tube, rincée à l'eau distillée, puis placée pendant 15 à 20 mn dans du tampon phosphate. Elle est alors mise dans une solution d'acridine-orange à l'obscurité (solution d'acridine-orange 1 p. 2000 dans un tampon de pH 3,09 composé de 50 ml d'acétate de sodium normal et de 48,5 ml d'acide chlorhydrique normal).

L'excès d'acridine-orange est ensuite retiré en passant les lamelles successivement dans quatre récipients contenant du tampon. Les lamelles sont montées en présence de tampon frais, sur des lames, et elles sont lutées avec un mélange paraffine-vaseline. Les préparations sont conservées à l'obscurité à +4°.

8) Microscope électronique.

Deux cultures ont été préparées pour une étude au microscope électronique des cellules infectées par le virus de l'anémie infectieuse.

Les leucocytes sont répartis à raison de 6 ml de suspension cellulaire dans des flacons de 60 ml. Les cellules de chaque flacon reçoivent 2 ml de surnageant de culture de leucocytes infectés et sont laissés pendant une heure à la température du laboratoire, au contact du virus. Le milieu est ensuite complété à 6 ml et changé 24h. après l'inoculation.

Trois flacons sont préparés et soumis à l'inoculation de virus chacun à 48h. d'intervalle. Parallèlement des flacons contenant des cellules témoins sont préparés.

Pour la première expérience, les cellules ont reçu le surnageant du 6ème passage de la souche "Vitasérone" en culture de leucocytes de cheval ; pour la deuxième expérience, le surnageant du 4ème passage de la souche "Wyoming" en culture de leucocytes.

L'état des cellules est suivi quotidiennement par observation au microscope à optique inversée.

Lors de l'apparition de l'effet cytopathogène sur les cellules des flacons inoculés, on recueille les cellules afin de les soumettre à une fixation, en vue de l'étude au microscope électronique.

Les techniques de fixation et d'inclusion employées par BERNHARD ( 12 ) sont les techniques classiques de microscopie électronique pour coupes de cellules.

La fixation est effectuée par action pendant une heure de la glutaraldéhyde à 2,5 % puis pendant une nouvelle heure du tétroxyde d'osmium à 2 %.

L'inclusion a lieu en Epon. La coloration est à base d'uranyl plomb.

C. Résultats.

1) Rapports antigéniques et immunogéniques entre les souches françaises et américaine de virus de l'anémie infectieuse.

Un cheval sain, "Wyoming" a reçu une injection de virus de l'anémie infectieuse, souche Wyoming. Ses réactions sont portées dans le tableau 7 .

Par ailleurs, la même souche a été inoculée à plusieurs reprises à deux chevaux infectés initialement par deux souches françaises et passés à l'état d'infection latente.

Les résultats obtenus sont portés dans les tableaux 8 et 9 .

2) Effet cytopathogène sur les leucocytes de cheval.

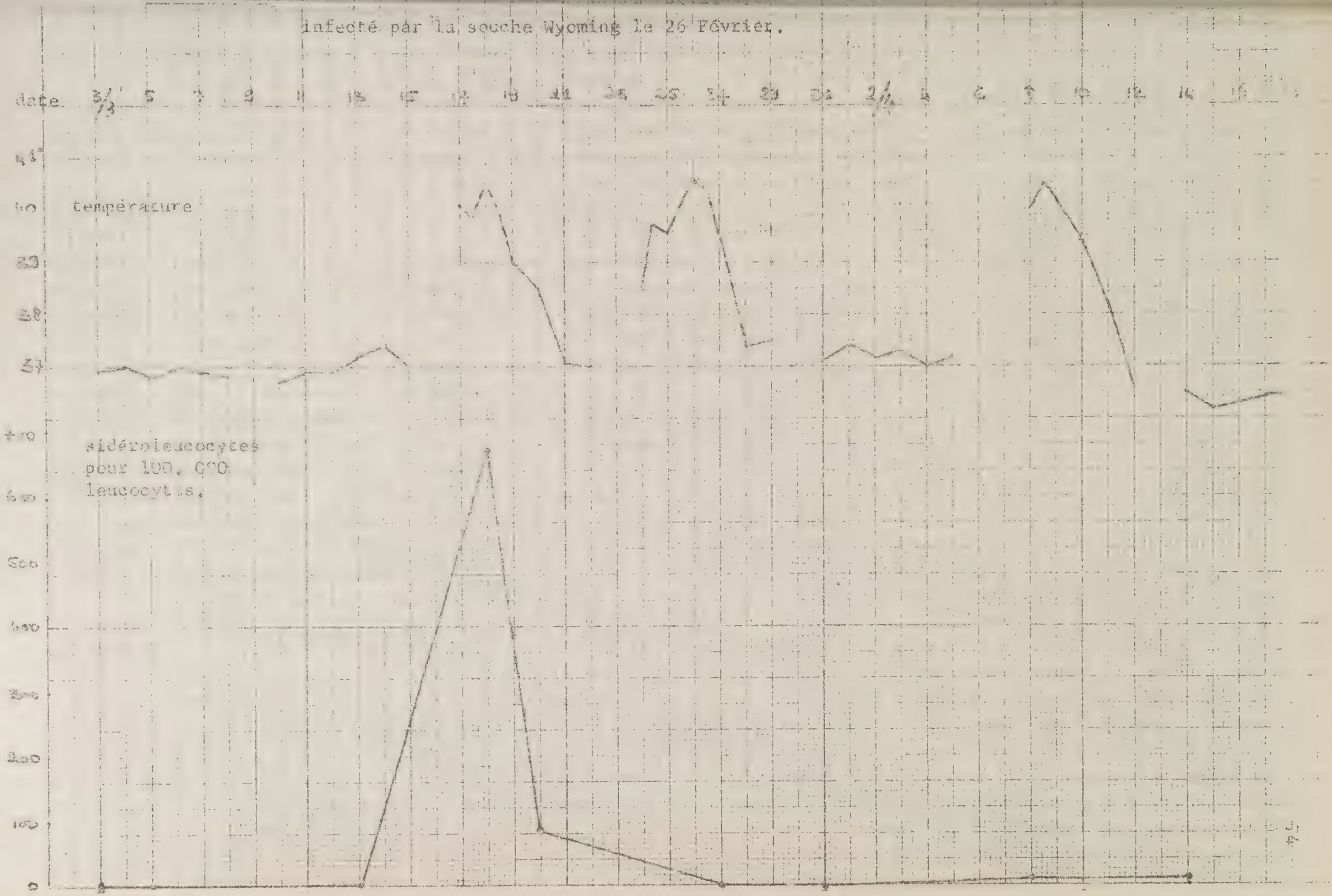
La comparaison des leucocytes inoculés et des leucocytes sains, effectuée soit sur les cellules vivantes, soit après fixation et coloration par le Giemsa ou par l'hémalun éosine, soit enfin au microscope électronique, permet d'aboutir aux résultats suivants :

a) Cellules vivantes.

Alors que les cellules témoins conservent un aspect normal, les leucocytes infectés présentent, plus ou moins tôt en fonction de la quantité de virus inoculée et du degré d'adaptation de la souche aux cultures leucocytaires, un effet cytopathogène. Celui-ci se traduit, sur un tapis de leucocytes vivants, par une modification de l'aspect individuel des cellules qui ont tendance à devenir plus rondes, plus globuleuses avant de se détacher peu à peu de la paroi du verre. Après plusieurs jours de culture, la différence est flagrante entre les leucocytes sains qui forment un tapis complet de cellules largement étalées sur le verre, et les leucocytes infectés qui se retrouvent sous forme de petits groupes de cellules de forme arrondie et séparés entre eux par des espaces libres.

L'effet cytopathogène provoqué par le virus de l'anémie infectieuse apparait en I4 à I7 jours lors de l'inoculation aux cellules du sérum d'animal atteint d'anémie infectieuse ou lors des tout premiers passages en

infecté par la souche Wyoming le 26 Février.



20 mars.

date 18/3 19 21 23 25 27 29 31 1/4 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22 24 26

40°

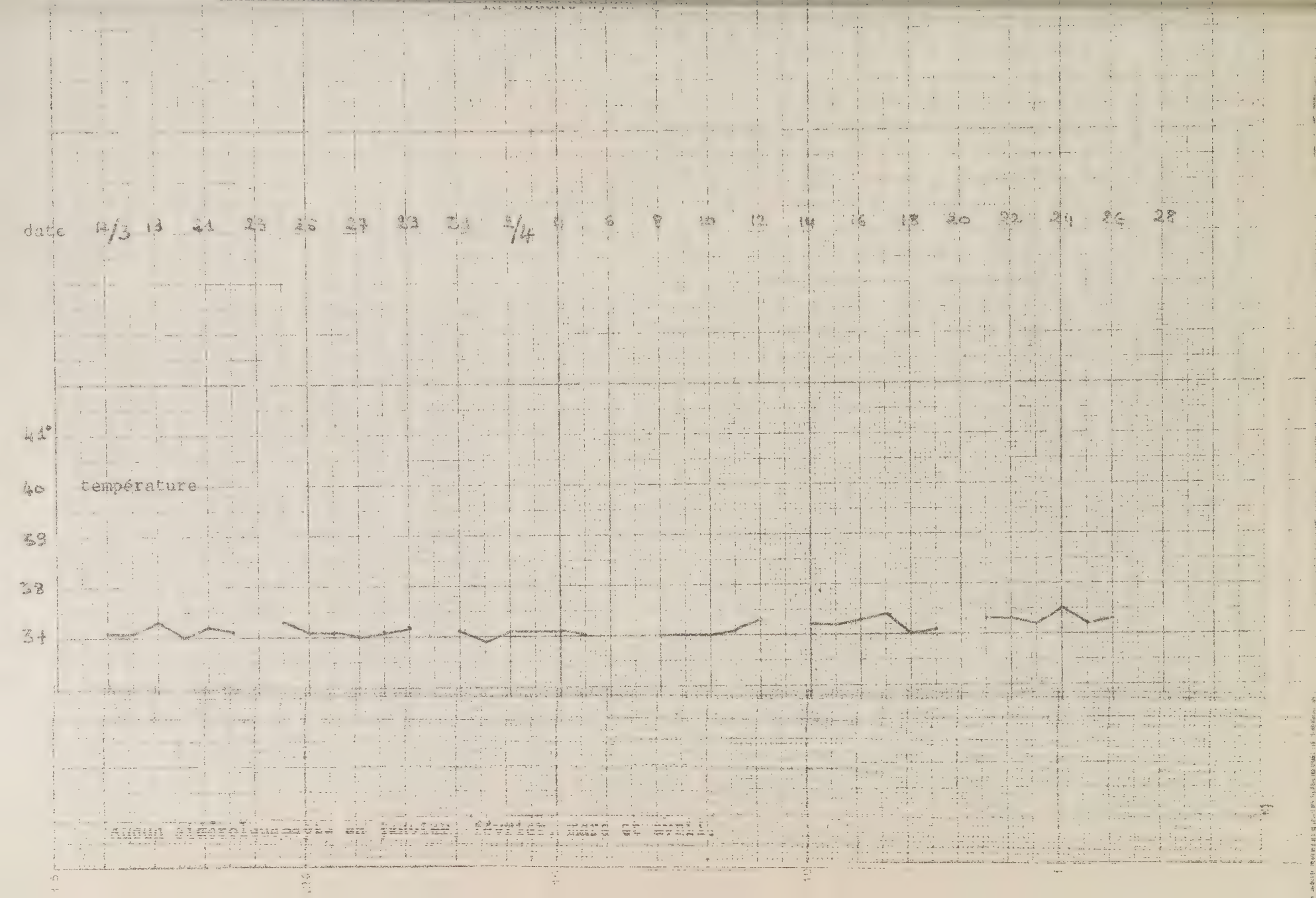
40 température

39

38

37

Aucun sidéroleucocyte en janvier, février, mars et avril.


date
12/3
13
21
23
25
27
29
31
2/4
4
6
8
10
12
14
16
18
20
22
24
26
28
41°
40
température
39
38
37

culture de leucocytes de cheval.

L'effet cytopathogène dans les cellules incubées à 30° apparait plus tard que lors d'une incubation à 37°.

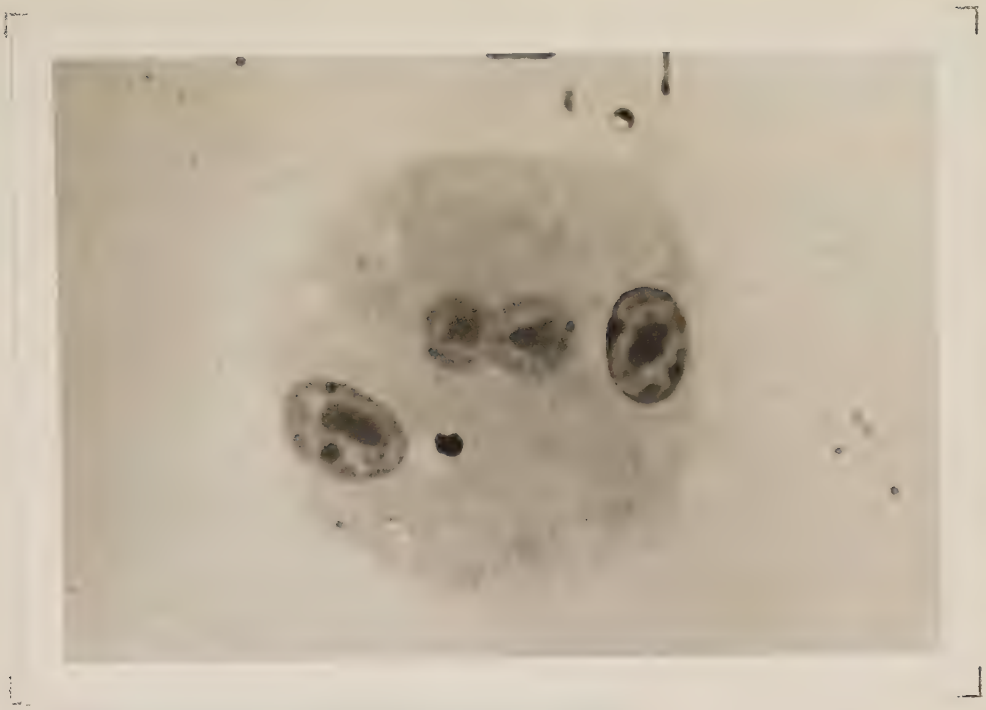
Nous avons constaté la nécessité de comparer constamment l'état des cellules infectées et celui des cellules témoins. De très nombreux facteurs peuvent en effet intervenir qui tendent à diminuer la vitalité des leucocytes en culture, surtout lors de survie prolongée pendant plusieurs semaines. Les leucocytes mis en présence de sérum de cheval normal conservent le même aspect que les leucocytes cultivés en absence de tout sérum de cheval.

b) Après coloration.

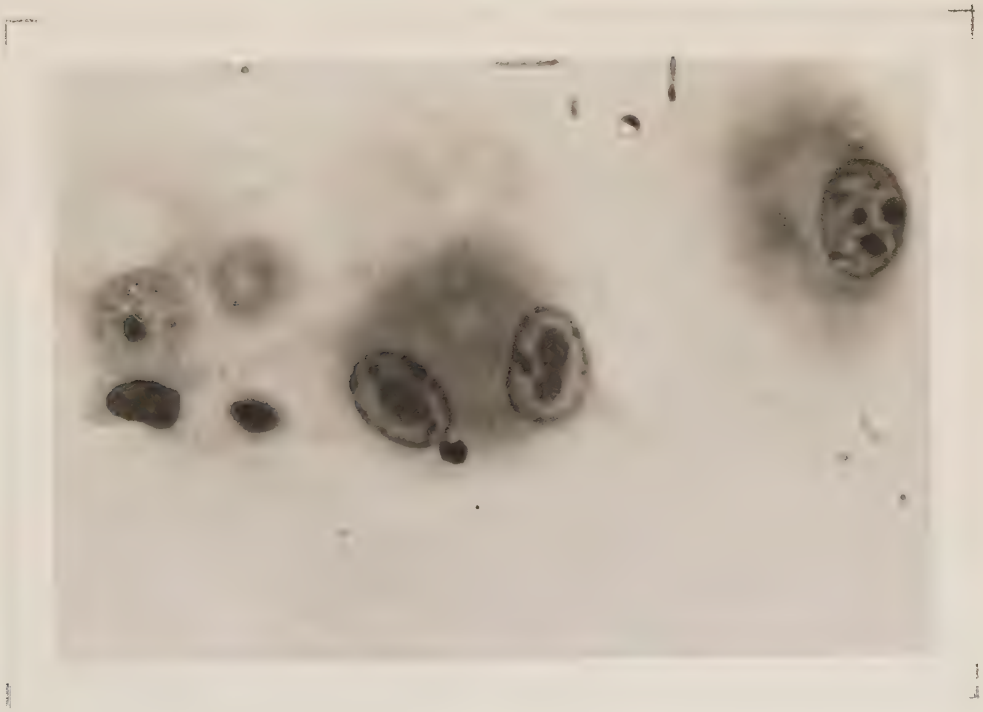
L'observation des leucocytes après coloration par le Giemsa ou par l'hémalun éosine permet de confirmer les résultats obtenus sur les cellules vivantes et de préciser l'action pathogène due au virus de l'anémie infectieuse. Les altérations cellulaires apparaissent après un temps moyen de huit jours et s'accentuent après 3 ou 4 jours pour aboutir à un détachement de toutes les cellules. Au milieu de leucocytes normaux, on peut distinguer certaines cellules dont le cytoplasme est devenu globuleux, plus fortement coloré par l'éosine et à contour circulaire. Ce phénomène apparait aussi bien sur les cellules isolées que sur les syncytiums.

Cet effet cytopathogène n'a donc rien de bien caractéristique.

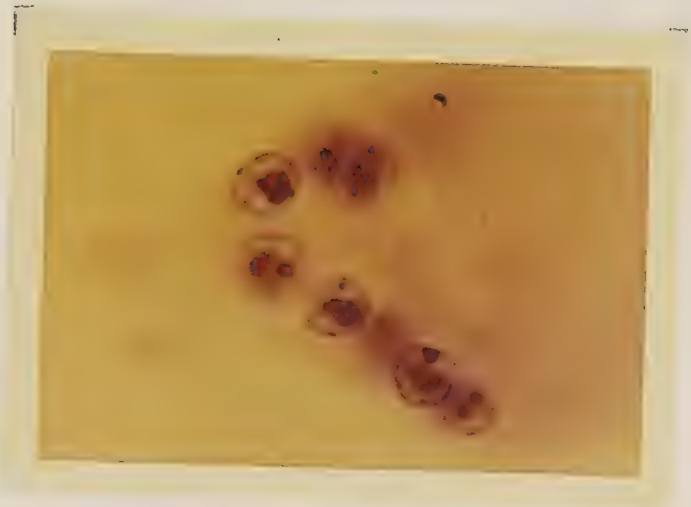
Cependant, dans certaines cultures il nous a été possible d'observer des inclusions intranucléaires éosinophiles ayant tendance à la basophilie dans les derniers stades de l'infection cellulaire. De telles images sont visibles dans les clichés 3, 4 et 5. Nous reviendrons, ultérieurement, lors de la discussion, sur la signification de telles images.



CLICHE 3 : Inclusions nucléaires dans une cellule infectée par la souche "Vitastérone"



CLICHE 4 : Inclusions nucléaires dans une autre cellule infectée également par l souche "Vitastérone"



CLICHE 5 : Inclusions éosinophiles nucléaires dans un syncytium infecté par la souche "Vitastérone".

3) Passages en série sur leucocytes de cheval.

A la date d'Avril 1969, nous avons réalisé les passages suivants :

- 10 passages en série pour la souche "Vitastérone"
- 9 passages en série pour la souche "Blanchette"
- 9 passages en série pour la souche "Vent des Prairies"
- 5 passages en série pour la souche "Wyoming".

Le délai d'apparition de l'effet cytopathogène sur les leucocytes de cheval est porté dans le tableau 10 .

A la lecture de ce tableau, on constate, comme nous l'avions annoncé précédemment, que l'effet cytopathogène apparait plus rapidement au fur et à mesure que le nombre de passages augmente. Ainsi pour la souche "Blanchette", ce délai qui était initialement de 17 jours est progressivement parvenu à 10 jours. De même pour "Vent des Prairies" et "Vitastérone" les délais sont passés respectivement de 16 et 15 jours à 1[illegible] jours. La même constatation se retrouve pour la souche "Wyoming".

La preuve de la réplication virale en culture de leucocytes a été apportée grâce à l'inoculation au cheval du surnageant d'une culture après un certain nombre de passages.

Le cheval nommé "Leucocyte" a reçu par voie intraveineuse 10 ml. de la souche "Vitastérone" après 9 passages en culture de leucocytes de cheval. La température de ce cheval avait été prise quotidiennement pendant plusieurs semaines et a continué à l'être après l'inoculation. Parallèlement, des examens sanguins avaient permis de constater l'[illegible] sidéroleucocyte dans le sang circulant de cet animal, et des nombres normaux pour les globules blancs, les globules rouges et la formule leucocytaire.

Douze jours après inoculation par voie veineuse de la culture de la souche "Vitastérone" en leucocytes de cheval, le cheval "Leucocyte" a présenté une hyperthermie qui a duré 3 jours, hyperthermie accompagnée de signes de fatigue, de faiblesse générale et de "tuchos". Les sidéroleucocytes sont apparus en nombre important à la fin de cette crise. L'évolution de la température et celle des sidéroleucocytes sont portées dans le tableau 11 .

Ces résultats (reproduction de la maladie chez l'animal neuf avec une incubation très courte) permettent d'affirmer que le virus de l'anémie

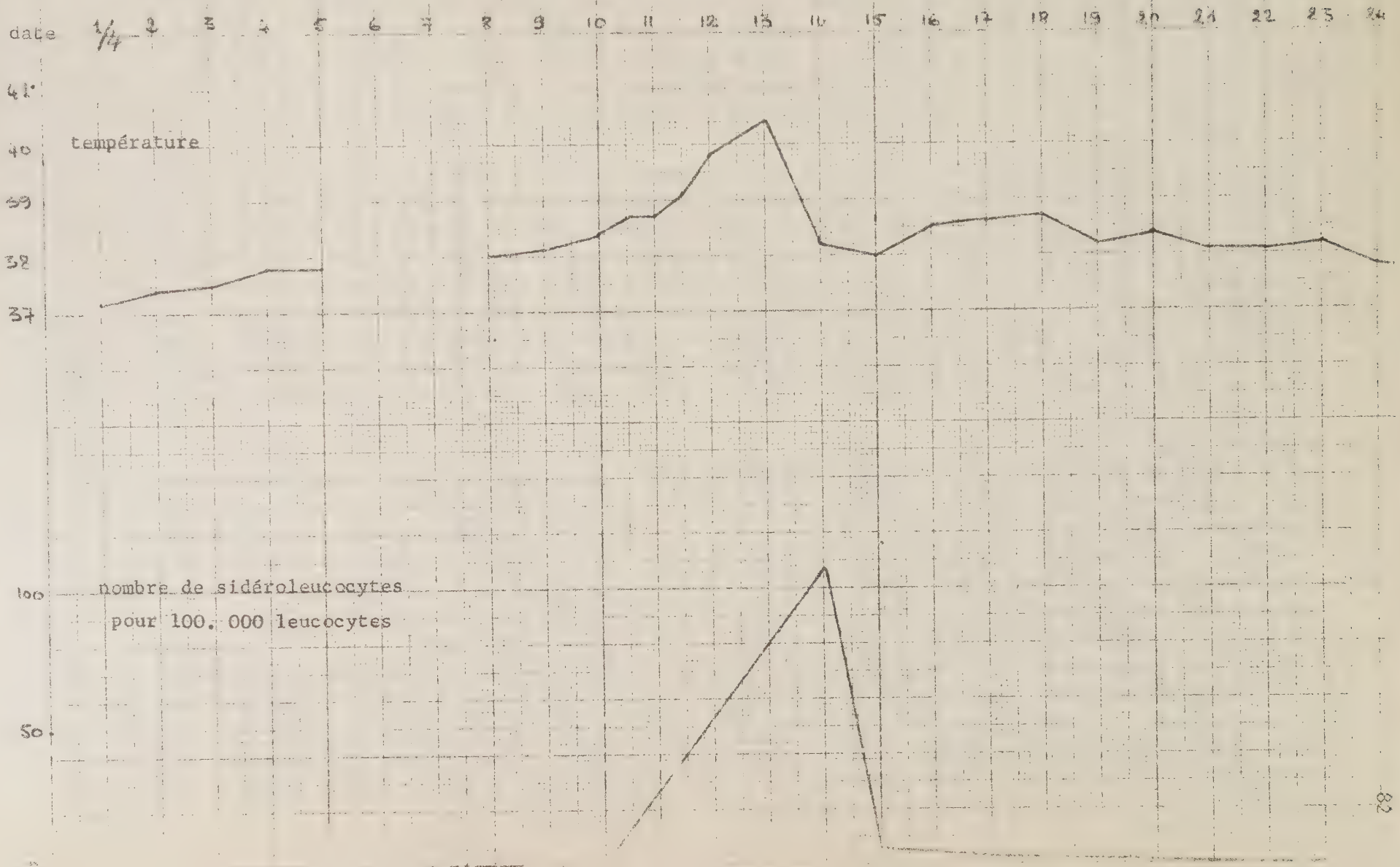
Tableau 10 : Passages en série de quatre souches de virus de l'anémie infectieuse sur culture de leucocytes de cheval.

| Numéro du passage | Souches virales | | | |
|---|---|---|---|---|
| | Vitastérone | Blanchette | Vent des prairies | Wyoming |
| 1er passage | 15 | 17 | 16 | 15 |
| 2e " | 11 | 15 | 10 | 11 |
| 3e " | 10 | 14 | 10 | 8 |
| 4e " | 10 | 13 | 13 | 12 |
| 5e " | 13 | 10 | 10 | 10 |
| 6e " | 11 | 11 | 11 | |
| 7e " | 11 | 10 | 10 | |
| 8e " | 10 | 12 | 12 | |
| 9e " | 12 * | 10 | 10 | |
| 10e " | 10 | | | |

Les nombres indiquent en jours le délai séparant l'inoculation des cellules, de la congélation.

* Le surnageant de ce passage a été inoculé à un cheval sain.

neuvième passage en culture de la souche "Vitastérone"



infectieuse a pu se multiplier en culture de leucocytes de cheval. Par ailleurs, ces 9 passages en leucocytes de cheval n'ont absolument pas diminué ou modifié sa virulence pour le cheval. En effet, les résultats obtenus après inoculation à un cheval de la souche "Vitastérone" d'origine, portés dans le tableau 12 , sont très proches de ceux-ci, notamment en ce qui concerne la durée d'incubation.

En raison du coût élevé de l'apport de cette preuve de succès de la réplication virale, nous n'avons pas vérifié ce même point pour les souches "Blanchette" et "Vent des Prairies". Cependant, étant donné que dans les tubes de culture les résultats obtenus sont semblables à ceux constatés pour la souche "Vitastérone", nous pouvons sans grande chance d'erreur, penser que les deux souches "Blanchette" et "Vent des Prairies" ont également été passées avec succès en culture de leucocytes de cheval.

Enfin, pour la souche "Wyoming", le nombre de passages en série est encore trop faible (cinq seulement) pour qu'il soit intéressant d'inoculer la culture à un cheval.

4) Autres systèmes cellulaires.

Aucun effet cytopathogène, aucune différence entre les cellules témoins et les cellules infectées par diverses souches d'anémie infectieuse n'a pu être décelé.

5) Titrage du virus sur leucocytes de cheval.

Les résultats obtenus lors du titrage du surnageant du 3ème passage de la souche "Vitastérone" en culture de leucocytes de cheval, sont portés dans le tableau 13 .

La lecture de ce tableau permet de constater que l'effet cytopathogène apparait plus lentement lorsque les dilutions sont importantes ($10^{-4}$) que lors de faibles dilutions.

Le titre obtenu lors de ce titrage est de $2 \times 10^{4,3}$ doses infectieuses culture de cellules 50 p.100.

6) Culture de leucocytes sous couche de gélose ou de gomme adragante.

Les résultats sont peu encourageants. En effet, quelques jours après

Vitastérone le 4 mars.

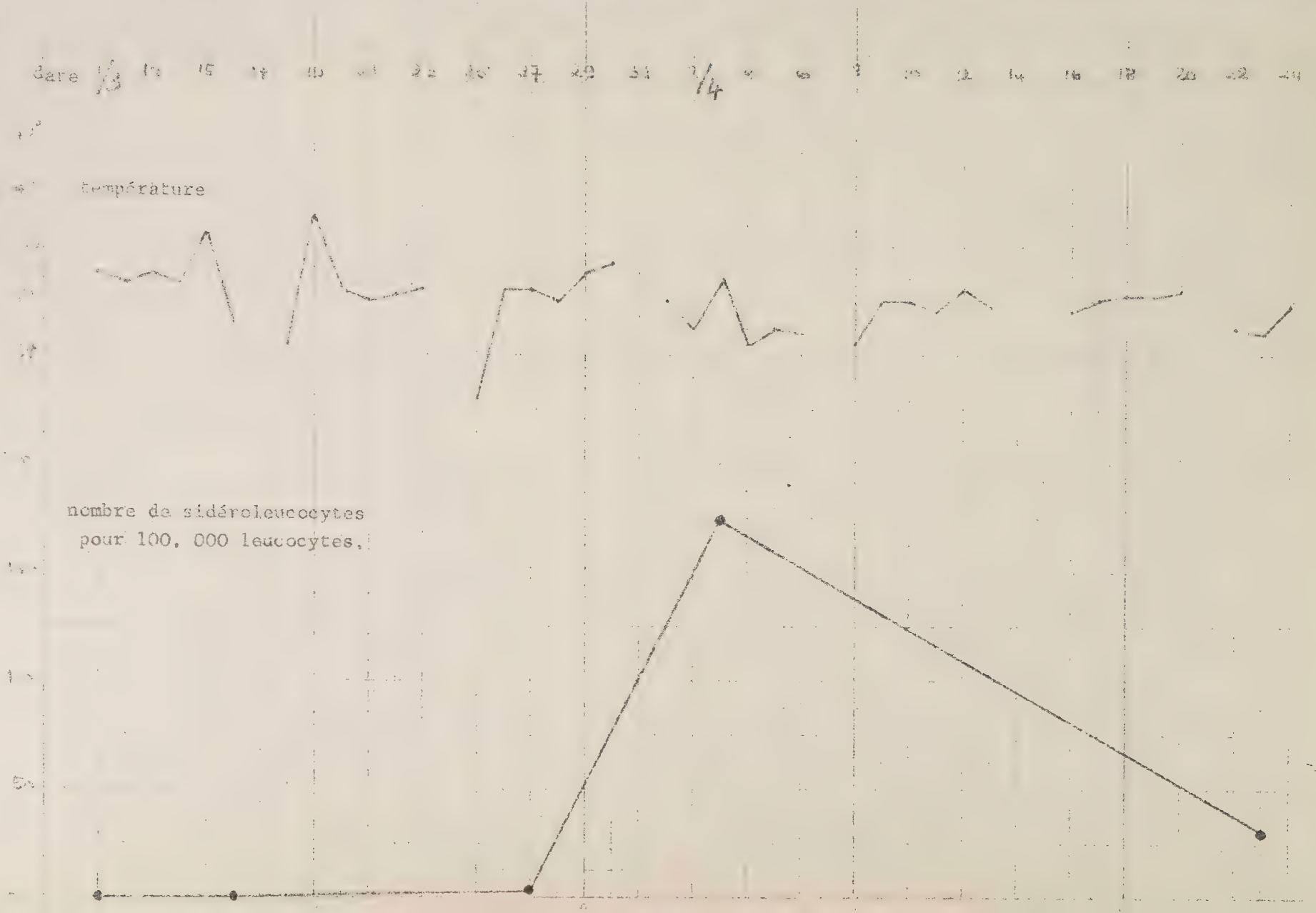


Tableau 13 : Titrage du virus de l'Anémie infectieuse sur culture de leucocytes de cheval.

| Dilutions de l'inoculum | Tubes | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| pur | + 8 | + 8 | | | |
| $10^{-1}$ | + 9 | + 10 | + 9 | + 10 | + 9 |
| $10^{-2}$ | + 10 | + 11 | + 10 | + 11 | |
| $10^{-3}$ | + 13 | + 13 | + 12 | + 13 | + 13 |
| $10^{-4}$ | + 14 | + 13 | + 14 | + 13 | 0 |
| $10^{-5}$ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| $10^{-6}$ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| $10^{-7}$ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Le signe + indique la présence d'un effet cytopathogène, le signe 0 l'absence d'effet cytopathogène.

Le chiffre qui suit le signe + indique le délai en jours de l'apparition de l'effet cytopathogène.

le recouvrement du tapis leucocytaire par le milieu gélosé ou la gomme agradante, les leucocytes présentent des phénomènes de dégénérescence et meurent. Dans ces conditions, notre intention de rechercher des plages produites éventuellement par le virus de l'anémie infectieuse sur les cultures de leucocytes n'a pas pu être réalisée.

7) Filtration.

Les cellules de tous les tubes ayant reçu un filtrat provenant du surnageant d'une culture virale en culture leucocytaire à travers des filtres millipore de diamètre 200 mμ, 100 mμ et même 50 mμ, ont présenté un effet cytopathogène.

Cet effet cytopathogène apparait plus tôt avec les filtrats obtenus sur filtres dont les pores ont un diamètre de 220 mμ, que sur filtres dont les pores ont un diamètre de 100 mμ ou de 50 mμ. (tableau 14).

Les cellules des tubes témoins n'ont présenté aucune altération.

D'après ces résultats, il semble possible de conclure que la taille du virus de l'anémie infectieuse est inférieure à 50 mμ.

8. Nature de l'acide nucléique.

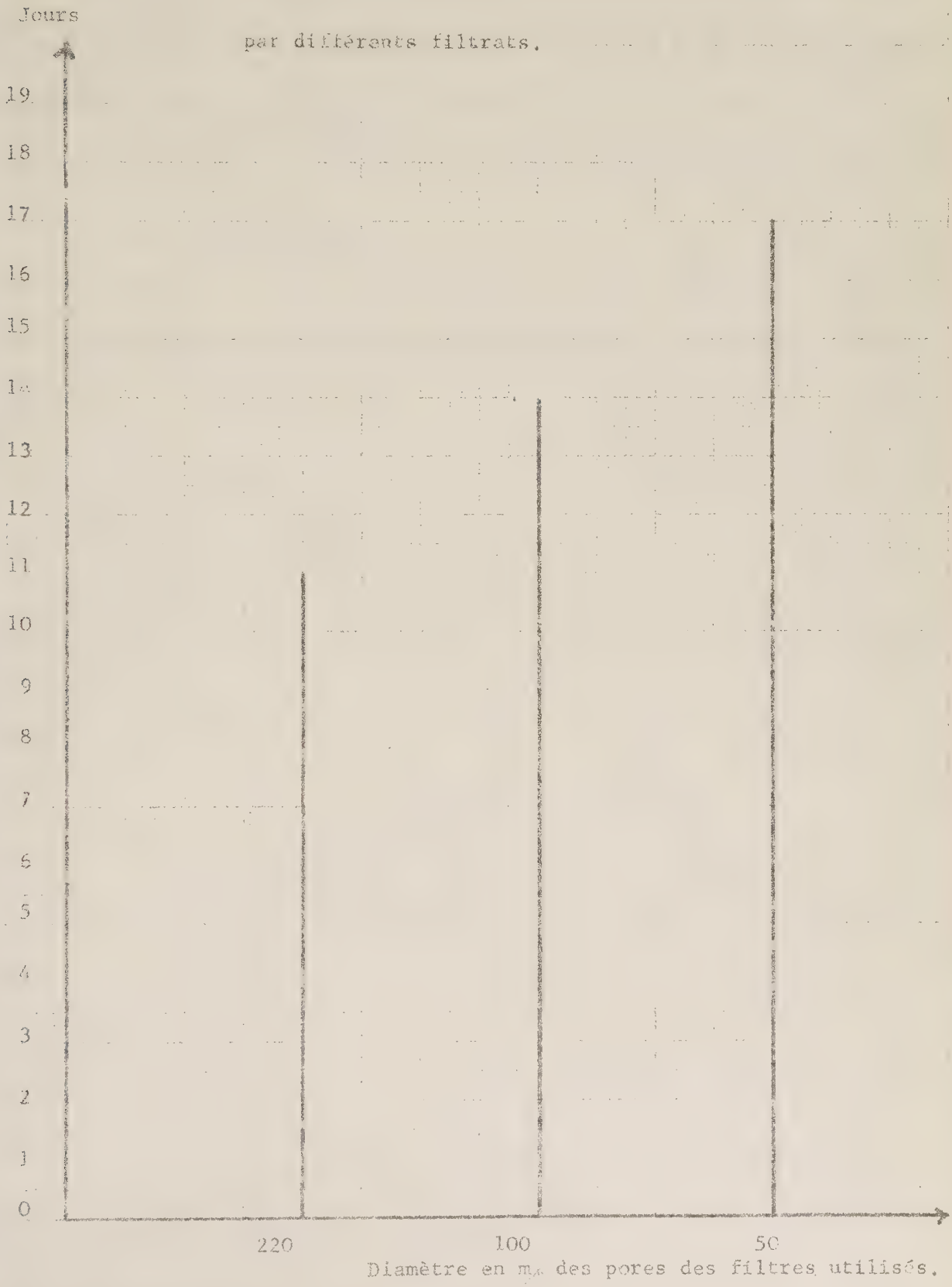
Deux techniques avaient été mises en oeuvre afin de tenter de déterminer la nature de l'acide nucléique viral.

a) Action de la 5 iodo 2 desoxyuridine.

Le système de contrôle employé, à savoir virus de la rhino-pneumonie -(virus à ARN) [illegible] a donné les résultats escomptés : la 5 iodo 2 desoxyuridine inhibe en effet toute apparition d'effet cytopathogène dans les cellules PK alors que les cellules infectées, en l'absence de cette substance, présentent rapidement des inclusions intranucléaires éosinophiles caractéristiques de ce virus du groupe de l'herpès.

Plusieurs expériences ont été répétées afin de confirmer les résultats obtenus avec le virus de l'anémie infectieuse.

Tableau 14 : Temps necessaire pour la destruction complète des cellules dans les cultures de leucocytes infectées par différents filtrats.



Ces résultats sont convergents : la 5 iodo 2 desoxyuridine, substance inhibant la synthèse de l'acide desoxyribonucléique n'empêche pas l'apparition de l'effet cytopathogène dans les cultures infectées par le virus de l'anémie infectieuse.

Ces résultats sont donc en faveur de l'existence dans ces cultures de leucocytes d'un virus à acide ribonucléique.

L'une de ces expériences a donné les résultats portés dans le tableau 15 .

b) Emploi de l'acridine-orange.

Quatre séries de 15 tubes à lamelles contenant des cultures de leucocytes de cheval ont été employées de la manière suivante : 3 séries ont été infectées à l'aide du 5ème passage de la souche "Vitastérone" ; la 4ème série servait de témoin.

Les 3 premières séries ont été colorées respectivement par le Giemsa, l'hémalun éosine et l'acridine orange. Cette façon de procéder a permis de comparer quotidiennement l'état de cellules saines d'une part, et celui de cellules infectées d'autre part, ces dernières étant suivies grâce à trois techniques différentes.

La coloration par l'acridine-orange des leucocytes témoins a donné d'excellents résultats. Les cellules isolées et les syncytiums présentaient un fond cytoplasmique orange s'atténuant lentement avec l'âge de la culture, et des noyaux à fluorescence verte très nette au milieu de laquelle on pouvait distinguer le nucléole.

L'aspect de ces cellules est présenté dans le cliché 6 .

Les cellules infectées à l'aide du virus de l'anémie infectieuse et colorées par l'acridine orange présentent pendant les premiers jours de culture un aspect semblable à celui des cellules saines. Ultérieurement, on retrouve les mêmes altérations que lors de l'observation après coloration par le Giemsa ou l'hémalun éosine, à savoir une rétraction du cytoplasme qui fixe davantage le colorant, suivie d'une destruction progressive des cellules.

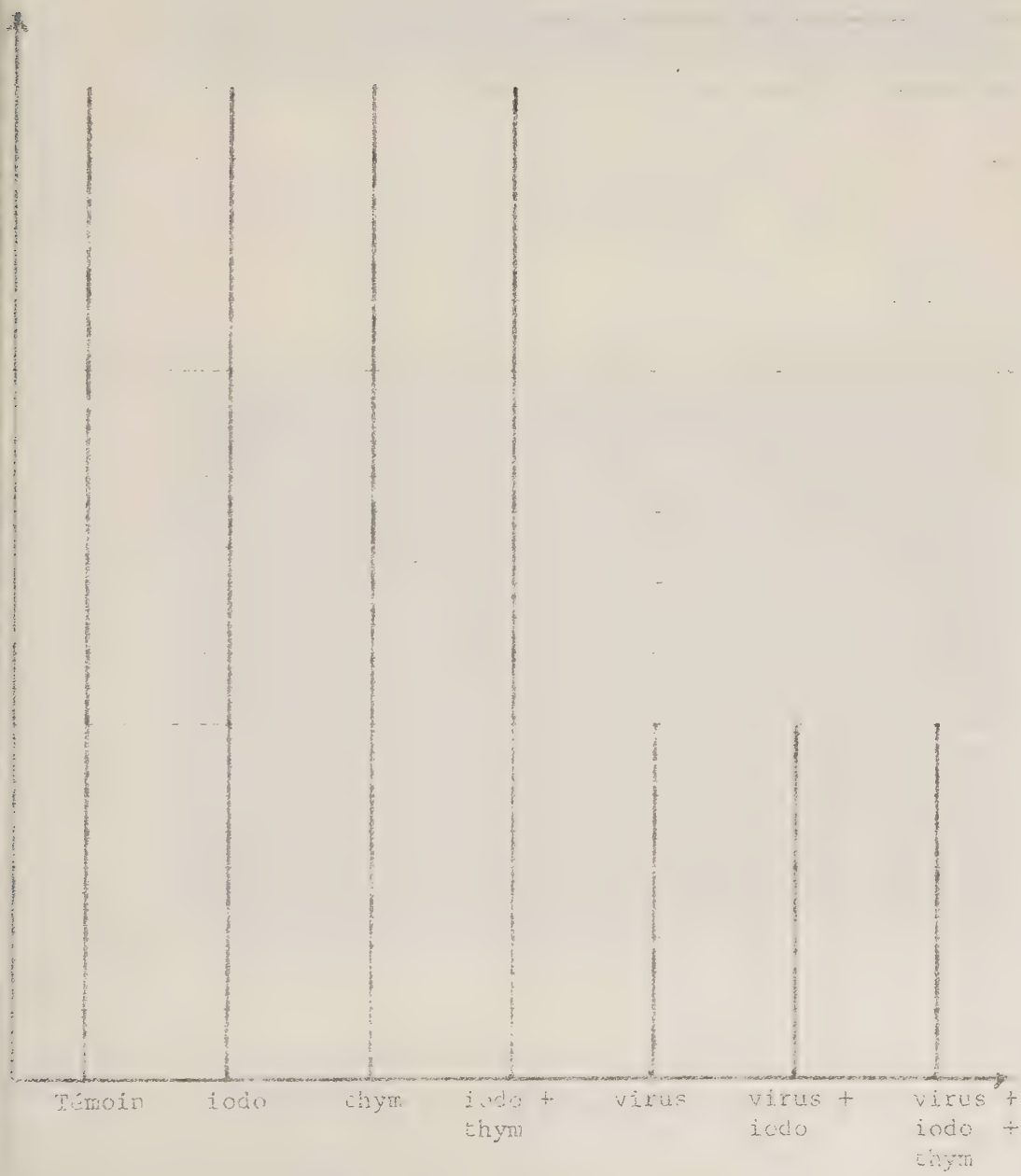
Nous avons pu constater lors de cet essai dans le noyau des cellules l'apparition d'inclusions à fluorescence verte. cliché 7.

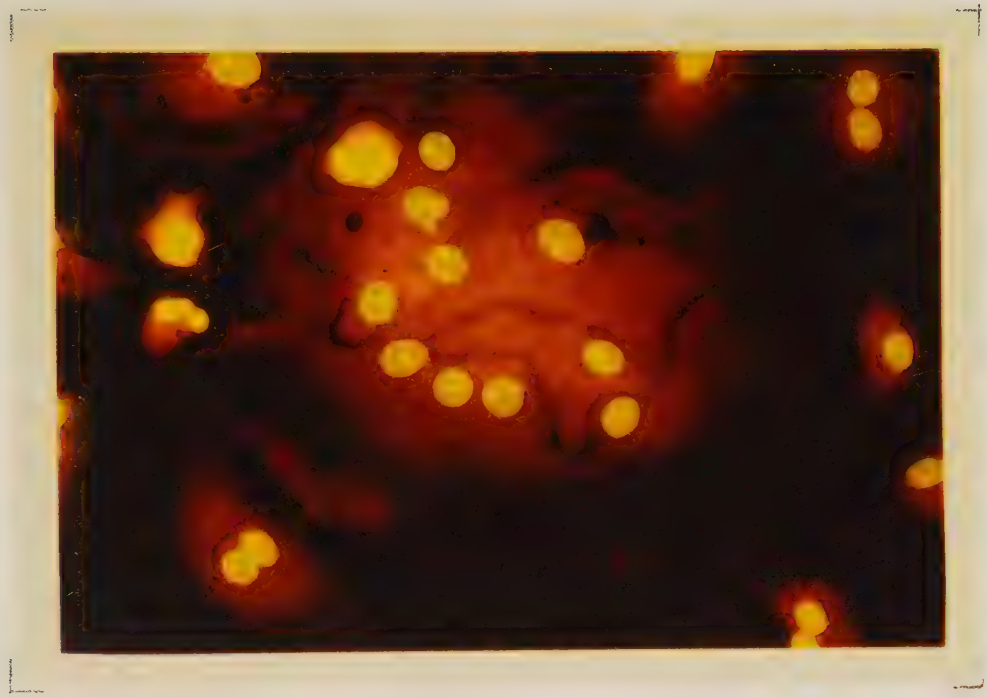
Lors de la progression de l'effet cytopathogène, les noyaux pâlissent progressivement pour finalement n'apparaître que comme de véritables "fantômes" d'un noyau très pâle au centre d'un cytoplasme globuleux, condensé et jaunâtre.

Tableau 15 : Inhibition de la réplication virale par la 5 iodo 2 desoxyuridine; survie des cellules.

iodo : 5 iodo 2 desoxyuridine 40µg/ml
thym : thymidine 80µg/ml.

urs





LICHE 6 : Syncytium coloré par l'acridine orange.

LICHE 7 : Coloration par l'acridine orange de leucocytes infectés par la souche Vitastérone. L'effet cytopathogène se traduit par un rabougrissement des cellules, leur détachement de la paroi du verre ainsi que par des inclusions nucléaires.

Il ne nous a pas été possible de constater soit l'apparition de quantité importante d'acide ribonucléique dans le cytoplasme, soit d'acide desoxyribonucléique dans le noyau.

Dans ces conditions, il nous est impossible, à l'heure actuelle, de conclure avec certitude quant à la nature de l'acide nucléique du virus de l'anémie infectieuse, d'après les résultats obtenus par la coloration à l'acridine orange.

9) Etude au microscope électronique.

À ce jour, les résultats obtenus lors de l'observation au microscope électronique de cultures de leucocytes infectés sont les suivants et ne peuvent être considérés que comme provisoires car la recherche se poursuit.

- La première expérience portait sur les leucocytes du cheval "Pam" infectés par le surnageant du sixième passage de la souche "Vitastérone".

Dans les cellules agées de 13 jours et infectées depuis 8 jours, il a été possible d'observer des particules virales. Celles - ci sont situées dans le noyau, ont un diamètre de 125 mμ et ressemblent à des virions du groupe herpès (cliché 8 ).

Jusqu'à présent seules ces particules ont été décelées dans les cellules infectées par la souche "Vitastérone".

- La seconde expérience portait également sur les leucocytes du cheval "Pam" mais infectés par le surnageant du quatrième passage de la souche "Wyoming".

Dans les cellules agées de 12 jours et infectées depuis 8 jours, comme les précédentes, ont été observées des images virales complètement différentes de celles décrites ci - dessus. Il s'agit en effet de petites particules de 22 mμ environ selon une disposition cristalline dans le cytoplasme des leucocytes.(Cliché 9 ).

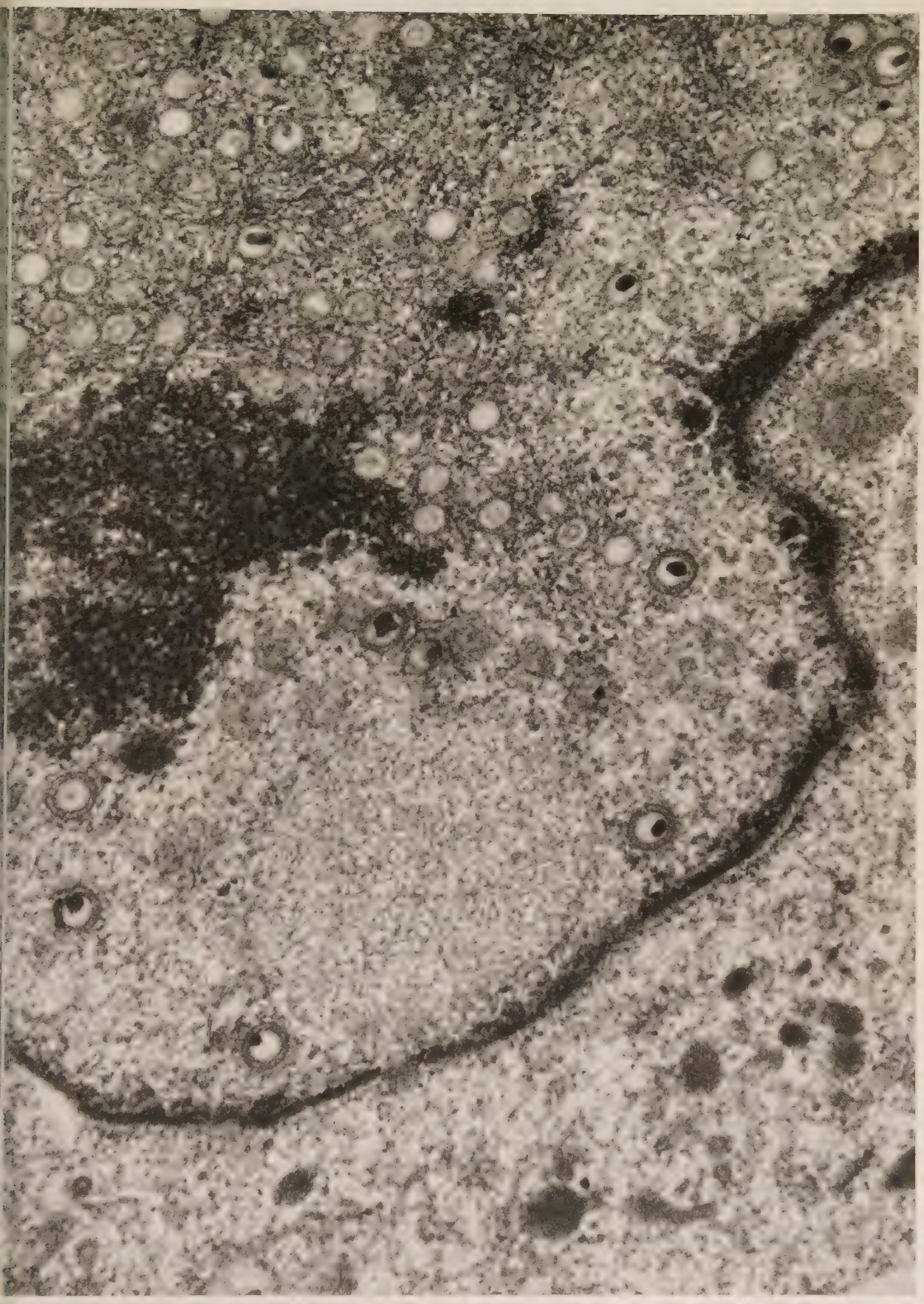
Jusqu'à présent, seules ces particules ont été observées dans les cellules infectées par la souche "Wyoming".

MICROSCOPIE ELECTRONIQUE.

(Clichés pris par le Docteur BERNHARD au Service de microscopie électronique de l'Institut Gustave Roussy à Villejuif).

Cliché 8 : Particules virales intra nucléaires, d'un diamètre de 125 mμ, du groupe de l'herpès. Leucocytes agés de 13 jours, infectés depuis 8 jours (souche "Vitastérone" sixième passage). Agrandissement final : 60. 000.

Cliché 9 : Particules virales intracytoplasmiques, d'un diamètre de 22 mμ, groupées de façon régulière au centre du cliché. Leucocytes agés de 12 jours, infectés depuis 8 jours (souche "Wyoming" quatrième passage). Agrandissement final : 60. 000.



D. Discussion.

La discussion portera sur les différents résultats précédemment indiqués.

1) Effet cytopathogène sur les leucocytes de cheval.

a) Cellules vivantes.

L'effet cytopathogène constaté sur les leucocytes vivants n'a rien de caractéristique. Il apparait dans des délais variables selon différents facteurs, notamment la concentration initiale du virus et le nombre de passages en leucocytes subis par la souche virale.

Il nous parait nécessaire d'insister sur l'obligation de comparer les cellules infectées et les cellules témoins. En effet, en l'absence de caractère spécifique de cet effet cytopathogène, il est possible d'attribuer à une action virale toute altération non spécifique des leucocytes mis en culture.

L'effet cytopathogène apparait plus lentement sur les cellules cultivées à 30°. Cette technique mérite cependant d'être étudiée ultérieurement car elle permettrait sans doute par des passages en série du virus à cette température de sélectionner des "mutants froids" à pouvoir pathogène vraisemblablement diminué. Il serait peut-être ainsi possible de préparer une souche virale suffisamment modifiée pour que l'on puisse envisager son usage en tant que vaccin. Cependant, les difficultés persistent en raison de la nécessité d'inoculer la souche à un cheval pour étudier d'une part l'absence de virulence résiduelle du virus, d'autre part son éventuel pouvoir immunigène.

b) Après coloration.

La coloration par le Giemsa ou l'hémalun éosine a permis de retrouver cet effet cytopathogène non spécifique.

La question se pose de savoir quelle valeur on peut attribuer aux inclusions éosinophiles nucléaires observées avec plusieurs souches de virus de l'anémie infectieuse.

Il faut, en la matière, faire preuve de la plus grande prudence, avant d'avancer une conclusion.

Différentes études nous incitent en effet à une telle prudence. Ce sont les expériences de BODON ( 14 ) qui a montré que pratiquement toutes les souches de virus de la peste porcine classique réputées cytopathogènes étaient en fait contaminées par un adénovirus responsable à lui seul de l'effet cytopathogène observé sur les cellules. Plus récemment, HORZINEK et coll. ( 43 ) ont apporté la preuve de la présence de trois virus dans une culture de virus de la peste porcine classique.

Par ailleurs, les observations de TOKUI (107 ) et celles de KOBAYASHI et KONO ( 57,58) mentionnant l'isolement d'agents cytopathogènes à partir de cultures de leucocytes de cheval sain ou de cellules de foetus d'équidés, incitent également à une grande prudence avant d'attribuer les inclusions nucléaires observées dans les leucocytes de cheval à une action du virus de l'anémie infectieuse.

A ce propos, les inclusions nucléaires éosinophiles décrites par KOBAYASHI et KONO ( 57 ) et présentées par plusieurs photos dans leurs publications sont très proches de celles que nous avons observées.

Plusieurs hypothèses peuvent être émises pour tenter d'expliquer l'origine de ces inclusions nucléaires :

1ère hypothèse : elles sont dues à l'action du virus de l'anémie infectieuse. Une telle hypothèse n'est guère satisfaisante, pour plusieurs raisons : la première est que les différents auteurs, en particulier Japonais et Américains, ayant étudié la replication virale en culture de leucocytes de cheval, n'ont pas observé de telles lésions. Par ailleurs, si l'on en croit les résultats de la technique à la 5 iodo 2 desoxyuridine qui sont en faveur d'un acide ribonucléique, il est peu classique d'obtenir une replication d'un virus à acide ribonucléique avec formation d'inclusions nucléaires.

La seconde hypothèse fait appel à l'intervention d'un autre virus, responsable, indépendamment de l'action du virus de l'anémie infectieuse, de telles lésions nucléaires. Il pourrait s'agir de virus orphelins comparables à ceux dé-

crits par TOKUI ( 107 ) et par KOBAYASHI et KONO ( 57 ). Cependant, l'absence de telles inclusions nucléaires dans les leucocytes témoins est plutôt contraire à cette hypothèse. En effet, si un virus orphelin était présent à l'état latent dans les leucocytes provenant de chevaux sains et mis en culture, on devrait retrouver de telles inclusions nucléaires éosinophiles aussi bien dans les cellules témoins que dans les cellules infectées.

Il reste alors au moins une autre hypothèse qui consiste à penser que ces lésions nucléaires éosinophiles sont dues à un virus différent de l'anémie infectieuse, lequel pour pouvoir exercer son action sur les cellules a besoin d'être "aidé" par un virus différent.

Il est impossible à l'heure actuelle de répondre avec certitude en faveur de l'une de ces hypothèses. Il est certain que si la première devait se révéler exacte, elle faciliterait le diagnostic de l'anémie infectieuse par la recherche d'inclusions nucléaires éosinophiles à la suite de l'inoculation de sérum de chevaux suspects d'anémie infectieuse à des cultures de leucocytes.

Nous avons essayé de retrouver de telles inclusions, en inoculant le matériel de départ employé pour les quatre souches de virus qui ont fait l'objet de cette étude à des cultures de leucocytes de cheval. Jusqu'à présent nous n'avons pas pu retrouver, lors de la primo-inoculation, de telles inclusions. L'origine de leur présence reste donc inconnue. Leur date d'apparition au cours des passages est également inconnue car les passages ont été réalisés en tubes ronds.

2) Passages en série sur leucocytes de cheval.

Lors de l'étude de la bibliographie portant sur le virus de l'anémie infectieuse, nous avons constaté qu'effectivement plusieurs auteurs avaient obtenu un nombre plus ou moins élevé de passages de virus de l'anémie infectieuse en culture de leucocytes de cheval. ISHITANI ( 47 ) était arrivé jusqu'à 70 passages en série.

La technique des passages ne pose pas, à l'heure actuelle, de problème majeur. Il suffit d'infecter tous les 15 jours environ une nouvelle culture de leucocytes de cheval à partir du surnageant congelé et décongelé trois fois de la culture précédente. Il est donc théoriquement possible de faire en moyenne une vingtaine de passages par an.

La preuve de la réplication virale par l'inoculation en retour au cheval demeure indispensable. Un tel procédé n'est certes pas pratique en raison du prix de revient de l'opération et des délais nécessaires pour connaître les résultats. Il serait souhaitable de posséder d'autres techniques permettant de révéler la présence du virus en culture cellulaire. Les auteurs Japonais se sont attachés à l'étude de la réaction de fixation du complément et ont obtenu, semble-t-il, une bonne corrélation entre le pouvoir infectant de la culture pour le cheval et son titre en fixation du complément. Cependant, ces techniques sérologiques restent illusoires en raison de la difficulté que l'on éprouve à récolter un matériel viral suffisamment pur pour obtenir un sérum spécifique dépourvu d'anticorps vis-à-vis de tissus normaux de cheval, notamment vis-à-vis d'extraits de leucocytes. Par ailleurs, le milieu de culture employé est très riche en sérum de veau (30 p. 100), ce qui constitue une nouvelle difficulté pour l'immunisation spécifique de petits animaux de laboratoire.

Il serait souhaitable d'étudier le comportement d'une ou de plusieurs souches virales après passages en série à 30°.

3) Autres systèmes cellulaires.

A l'exception des leucocytes de cheval, les deux seuls systèmes qui semblent avoir permis une réplication du virus de l'anémie infectieuse sont les cellules de moelle osseuse d'une part, et les thymocytes d'autre part. Tous les autres systèmes étudiés en sont revenus négatifs. Un auteur cependant a signa-

ler, celui résultant des travaux de SAURINO et coll. ( 87 ) d'après lesquels différentes souches cellulaires, notamment les cellules KB, permettraient d'obtenir un effet cytopathogène et une réplication du virus de l'anémie infectieuse. Mais ces travaux n'ont jamais obtenu de confirmation dans un autre laboratoire. Notre donc eu la matière (cellules KB) tend même à infirmer ces constatations.

Récemment, EL-ZEIN ( 26 ) s'est heurté aux mêmes résultats négatifs en employant plusieurs systèmes cellulaires autres que les leucocytes de cheval. Cet auteur en arrive même au point de parler de virus défectif pour l'anémie infectieuse.

Il semble donc que seuls soient utilisables à l'heure actuelle les leucocytes de cheval pour l'étude du virus de l'anémie infectieuse en cultures cellulaires. Les travaux de SAURINO et coll. demandent à être considérés avec une grande réserve.

4) <u>Titrage du virus sur leucocytes de cheval</u>.

Le titre obtenu au cours de notre travail est très voisin de celui signalé par KOBAYASHI et KONO (33,61). Un tel titre reste faible. Il est très certainement à l'origine des difficultés qu'ont éprouvé les différents chercheurs pour observer le virus de l'anémie infectieuse au microscope électronique. En effet, avec des concentrations qui ne dépassent pas $10^5$ à $10^{5,5}$ doses infectieuses culture de tissus 50 p. 100 par ml, il devient fort improbable de pouvoir observer des particules virales au microscope. Ce qui permet de comprendre les différences trouvées par les auteurs qui ont tenté une telle étude (cf. Ière partie : étude du virus de l'anémie infectieuse).

Il serait intéressant de répéter les titrages du virus de l'anémie infectieuse au cours des passages successifs sur culture de leucocytes de cheval afin de déceler une éventuelle augmentation de la concentration des particules virales dans le surnageant des cultures.

5) Culture des leucocytes sous couche de gélose.

Cette technique ne nous a pas permis d'obtenir une survie des leucocytes pendant un temps suffisant pour étudier la réplication du virus de l'anémie infectieuse avec formation de plages éventuelles.

Le faible nombre d'essais effectués en ce sens ne suffit cependant pas pour condamner toute tentative dans ce domaine et il serait souhaitable de recommencer ces expériences dans cette optique, après modification des conditions expérimentales.

6) Filtration.

La taille exacte du virus de l'anémie infectieuse n'est pas connue. Il faut, en effet, se méfier des appréciations portées après étude au microscope électronique, car il a été prouvé (cf. étude de la morphologie virale dans la première partie) que des confusions sont possibles en particulier avec des particules de ferritine.

On peut penser que le virus de l'anémie infectieuse est un petit virus dont la taille est inférieure à 50 mμ. Ces résultats sont en harmonie avec ceux de [illegible] ( 7 ), 18 à 50 mμ, de ARAKAWA et coll. ( 1 ), 20 à 60 mμ, de [illegible] et coll. ( 84 ) 11 à 59 mμ, de ISHII et coll. ( 46 ), 20 à 50 mμ, de [illegible] et coll. ( 81 ), 50 mμ, de CAINER et coll. ( 31 ) 20 mμ, tous auteurs qui avaient utilisé des produits virulents (sérum ou organes) pour leur étude.

7) Nature de l'acide nucléique.

a) Action de la 5 iodo 2 desoxyuridine.

Les résultats obtenus par l'emploi de la 5 iodo 2 desoxyuridine sont en faveur de l'existence d'un virus à acide ribonucléique puisque l'effet cytopathogène apparait même en présence de l'inhibiteur de la synthèse de l'acide désoxyribonucléique.

Etant donné les réserves qui ont été émises, lors de la discussion de la nature des inclusions nucléaires éosinophiles rencontrées dans certaines cultures et des hypothèses avancées quant à l'intervention possible d'autres

virus, la preuve définitive de la nature de l'acide nucléique du virus de l'anémie infectieuse reste à apporter. Elle le sera en effectuant plusieurs passages en série d'une souche virale en présence de 5 iodo 2 desoxyuridine et en inoculant à un cheval le produit de ces passages. L'apparition de la maladie chez l'animal à la suite d'une telle inoculation entraînerait la conviction quant à la nature de l'acide nucléique du virus de l'anémie infectieuse.

Il semble donc, à l'issue de cette étude, que l'on puisse proposer pour la structure du virus de l'anémie infectieuse les éléments suivants : petit virus de taille inférieure à 50 mμ , à acide ribonucléique (absence d'inhibition par la 5 iodo 2 desoxyuridine), de symétrie inconnue (vraisemblablement cubique ), enveloppé (sensible à l'éther). Ces différentes propriétés méritent cependant d'être encore vérifiées et étudiées grâce à diverses techniques.

B) Pouvoir immunigène du virus de l'anémie infectieuse.

A l'occasion de cette étude sur le virus de l'anémie infectieuse en culture de leucocytes de cheval, il nous a été donné de comparer le pouvoir immunigène des souches isolées en France à Alfort et de la souche américaine Wyoming.

Nous avons vu, lors de l'étude bibliographique du virus de l'anémie infectieuse, qu'il était impossible à l'heure actuelle de trancher entre l'unicité ou la pluralité des types antigéniques et immunogéniques du virus de l'anémie infectieuse.

Les résultats d'inoculation croisée de souches d'Alfort et de la souche Wyoming nous ont permis de constater l'absence de différence sur le plan immunologique entre ces virus.

En effet, alors qu'un cheval neuf inoculé à l'aide de la souche Wyoming présentait les premiers signes de la maladie après une incubation de 19 jours (cf. courbes de température et d'évolution du nombre de sidéroleucocytes), deux chevaux infectés latents par des souches de virus françaises, inoculés par le virus Wyoming à plusieurs reprises ne présentaient aucune hyperthermie, aucun signe de la maladie et aucun sidéroleucocyte (cf. courbes 8 et 9 ).

Il semble donc bien que l'on puisse conclure à l'identité immunologique des souches [illegible] et de la souche Wyoming.

9) Microscope électronique.

Les résultats obtenus lors de l'étude au microscope électronique de cultures de leucocytes infectées par des souches de virus de l'anémie infectieuse sont complexes.

En effet, dans deux préparations différentes, ayant pour origine les cellules d'un même cheval (Pam.) mais inoculées par deux souches distinctes de virus, on observe, pour chacune, des images différentes de virus.

A la lumière des autres résultats obtenus, notamment l'effet cytopathogène, et des travaux déjà effectués en microscopie électronique, par d'autres auteurs, nous pouvons :

1) émettre une remarque préliminaire,

2) poser les questions et

3) faire les commentaires suivants :

1) Avant tout, ces résultats ne constituent qu'une étape prometteuse mais provisoire dans une série d'expériences.

2) a) Le virus observé dans le noyau des cellules infectées par la souche "Vitastérone" est-il le virus de l'anémie infectieuse ?

b) ou bien ce dernier est-il le virus trouvé dans le cytoplasme des cellules infectées par la souche "Wyoming" ?

c) ou enfin, dernière hypothèse, le virus de l'anémie infectieuse est-il différent de chacun de ces deux virus ?

Reprenons ces hypothèses l'une après l'autre :

a) A la première d'entre elles, il semble que l'on puisse répondre par la négative.

En effet, la taille de ces particules (125 mμ ) est nettement plus élevée que celle trouvée par les différents auteurs qui ont étudié le virus de l'anémie infectieuse par filtration, ultracentrifugation et microscopie électronique, ainsi que par nos expériences de filtration sur filtres Millipore dont le diamètre des pores était de 50 mμ .

Par ailleurs, ce virus présent dans le noyau, à morphologie d'herpès virus, possède vraisemblablement un acide désoxyribonucléique alors que nos expériences portant sur l'emploi de la 5 iodo désoxyuridine tendent à prouver que le virus responsable de l'effet cytopathogène en culture de leucocytes est un virus à ARN.

Il semble donc que l'on puisse conclure avec une quasi certitude que ce virus n'est pas le virus de l'anémie infectieuse.

Il pourrait alors s'agir d'un virus orphelin, voisin de ceux isolés par KONO et KOBAYASHI (58) dans des cultures de cellules rénales et de moelle osseuse de cheval et qui appartenaient au groupe de l'herpès sans être toutefois des souches de virus de la rhinopneumonie équine.

Ces virus "orphelins" isolés par KONO et KOBAYASHI (58) provoquaient en l'apparition d'inclusions nucléaires éosinophiles dans les cellules infectées.

L'effet cytopathogène était parfois tardif. Ainsi, pour les trois souches isolées par ces auteurs, la première, $HK_2$ a été décelée 18 jours seulement après la mise en culture des cellules rénales de cheval, et ce, dans un tube seulement sur 141 ; la seconde, $HK_6$ seulement lors d'un premier repiquage de cellules rénales de cheval ; la troisième, $HBM_7$, au neuvième repiquage de cellules de moelle osseuse provenant du même cheval que pour $HK_6$.

Ces virus orphelins doivent être fréquents chez le cheval, puisque KONO et KOBAYASHI (58) indiquent avoir isolé depuis treize souches supplémentaires à partir du rein, de la moelle osseuse, des amygdales, du mucus nasal et des leucocytes de chevaux. TOKUI (107) parvient aux mêmes conclusions .

Il est donc vraisemblable que les images virales observées dans les cellules infectées par la souche "Vitastérone" correspondent à de tels virus orphelins. Ce virus serait responsable des inclusions nucléaires éosinophiles décrites et rapportées dans les clichés 3, 4 et 5.

Quelle peut être l'origine de ce virus ? Il est vraisemblable qu'il s'agit d'un virus latent présent dans les leucocytes mis en culture. Il est difficile pour ne pas dire impossible, de savoir à quel moment, au cours des passages, a été "récupéré" ce virus. En effet, les travaux mentionnés ci dessus de KONO et KOBAYASHI, montrent la latence parfois très longue de ce virus avant qu'il se manifeste.

Il peut être même ne manifeste - t - il qu'en présence d'un autre virus, notamment le virus de l'anémie infectieuse. On peut en effet remarquer que seules les cultures infectées permettent d'observer un tel effet cytopathogène et des particules virales alors que les leucocytes témoins, ne présentent ni inclusion cellulaire, ni particules virales nucléaires. Or, la différences essentielle entre cellules témoins et cellules infectées réside dans la présence du virus de l'anémie infectieuse dans les cultures infectées ; et cette présence a été prouvée justement pour la souche "Vitastérone" grâce à l'inoculation en retour au cheval après 9 passages en série en cultures de leucocytes.

Il est vraisemblable qu'une étude plus complète, en cours, permettra de

trouver dans ces cultures, à côté de ces virus orphelins, les virions responsables de l'anémie infectieuse.

Enfin, pour clore les commentaires concernant ce premier type de virus observé dans nos cultures de leucocytes, signalons une différence de taille entre les souches isolées par KONO et KOBAYASHi qui traversent les pores dont le diamètre est de 50 m$\mu$ alors que la taille de nos particules évaluée au microscope électronique est de 125 m$\mu$ .

b) Répondre positivement à la seconde question énoncée plus haut, est en fait, répondre en même temps à la troisième.

Or, il semble que l'on puisse penser effectivement que les particules observées dans les cellules infectées par la souche Wyoming (cliché 9 ) sont des virus de l'anémie infectieuse des équidés.

Toutes les données (d'autres auteurs et les nôtres) concordent en effet : il s'agit d'un petit virus (22 m$\mu$ ) à ARN, à developpement cytoplasmique.

Ceci est en harmonie avec nos résultats de filtration et d'emploi de la 5 iodo desoxyuridine.

Ceci vient également recouper les résultats obtenus par GAINER et coll. (31) qui ont observé au microscope électronique dans certaines cellules hépatiques d'un poney mort après l'inoculation de la souche Wyoming, une disposition en cristaux de particules mesurant 25 m$\mu$ .

Il reste cependant necessaire, avant de pouvoir affirmer cette notion en toute certitude, de retrouver de telles particules dans les cultures infectées par d'autres souches que la souche Wyoming ("Vent des Prairies","Blanchette", "Vitastérone") et de n'en jamais retrouver dans les cellules saines.

Conclusion.

Nos recherches ont porté essentiellement sur l'étude du virus de l'anémie infectieuse produit en culture de leucocytes de cheval.

Pour ce faire, nous avons d'abord rassemblé les élements de la littérature concernant d'une part, la culture de leucocytes des principales espèces animales et de l'homme, d'autre part les propriétés du virus de l'anémie infectieuse.

Nous avons ensuite essayé de déterminer quelles sont les conditions permettant d'assurer régulièrement la plus longue survie des leucocytes de cheval d'une telle

Après avoir défini les principaux paramètres dont dépend le succès technique nous avons employé cette dernière pour l'étude du virus de l'anémie infectieuse.

Les principaux résultats sont les suivants :

Le virus de l'anémie infectieuse se multiplie en culture de leucocytes de cheval en entrainant un effet cytopathogène d'apparition plus ou moins tardive selon la concentration virale et le nombre de passages de la souche virale en cultures cellulaires.

Il est possible de titrer le virus en culture de leucocytes.

Aucun autre système cellulaire employé (cellules KB, NIL, $PK_{15}$, cellules rénales de singes) n'autorise l'apparition d'effet cytopathogène.

Quatre souches de virus (trois souches isolées à Alfort et la souche américaine Wyoming) immunogéniquement identiques ont été passées en série sur leucocytes de cheval. La souche "Vitastérone" après 9 passages en cultures de leucocytes n'a subi aucune modification de son pouvoir pathogène.

Les expériences de filtration et d'utilisation de la 5 iodo 2 desoxyuridine amènent à conclure que le virus de l'anémie infectieuse est un petit virus à acide ribonucléique. Ces conclusions sont corroborées par les résultats obtenus par observation au microscope électronique grâce auquel ont été decelées des particules de 27 mμ à disposition cristalline dans le cytoplasme des leucocytes infectés.

Un virus cytolytique appartenant au groupe herpès est apparu dans les cultures où il a été décelé au microscope électronique et par son effet cytopathogène se traduisant par des inclusions éosinophiles nucléaires.

# B I B L I O G R A P H I E


. ARAKAWA (S.), KANEKO (T.), SEKI (T.) et MUTO (S.). Yokohama, med. bull., 1957, 8, 48

. ARAKAWA (S.), KANEKO (T.), SEKI (T.) et MUTO (S.). Jap. J. Microbiol., 1960, 4, 25.

. BALOZET (L.). Arch. Inst. Pasteur Tunis, 1935, 24, 268.

. BALOZET (L.). C. R. Soc. Biol., 1935, 119, 68.

. BALOZET (L.). Arch. Inst. Pasteur Tunis, 1937, 25, 279.

. BALOZET (L.). Arch. Inst. Pasteur Tunis, 1938, 27, 241.

. BALOZET (L.). C. R. Ac. Sc., 1939, 209, 177.

. BALOZET (L.). C. R. Ac. Sc., 1939, 209, 401.

. BALOZET (L.). Bull. Soc. Path. Exot., 1939, 32, 566.

. BALOZET (L.), in LEVADITI (C.), DEPLEN (P.), et BURGE (J.). Poliomyélite Ed. Paris, 1947, p. 843

. BÜLOW (K.) et SCHWARTZMAN (G.). Arch. Virusforsch., 1966, 16, 24.

. BERNARD (W.). Communication personnelle.

. BRUST (F. V.). Bull. Off. Int. Epiz., 1955, 43, 26.

. BOTNA (L.). Bull. Vet. Inst. Pulawy, 1966, 16, 3[illegible].

. BURGER (D.), BENSON (C. [illegible]), MOHAYUDI (N.) et GOODAMS (J. R.). 18e Congr. Mond. Vét. Paris, 1967, p. 814

. CARRE (H.) et VALLEE (H.). C. R. Acad. Sc., 1905, 141, 196.

. CARRE (H.) et VALLEE (H.). Rev. gén. Méd. Vét., 1906, 8, 530.

. CARRE (H.) et VALLEE (H.). Rev. gén. Méd. Vét., 1907, 9, 12.

. Commission japonaise. 1914. Tokyo, Imp. Home Administration Bureau.

. DESCARPENTRIES. Communication personnelle.

. DITCHFIELD (W. J. B.). Lab. Pr. Lond., 1967, p. 172.

. DITCHFIELD (W. J. B.) et BOWES (V. W.). Proceedings of the first international conference on foot and mouth disease. Stresa, 1966, p. 65.

. DITCHFIELD (W. J. B.), WADDELL (C. H.), [illegible] (C. E.) et TEGLAND (M. B.). J. Am. Vet. Med. Assoc., 1967, 151, 1[illegible].

. DRAGUS (M. F.) et DOMAGO (L. [illegible]). Proceed. Penn. Acad. Philadelphia, 1954.

. DUNNE (H. W.), LUEDKE (A. J.) et HOGANSON (J. F.). Amer. J. Vet. Res., 1958, 19, 706

EL - ZEIN (C.). Dirs Arzneim., 1968, 29 N. 697.

FAUCONNIER. 10e cours de techniques des cultures cellulaires à l'Institut Pasteur. 1965

. FAYE. Communication personnelle.

. FRIES (D.), DEVON (P. A.), BRUNAT (W.), GROLIERE (J.), SEVILLARD (J. P.) et TRAEGER (J.). Rech. Biol., 1967, 12, 220

. GAINER (J. H.), Final Proceedings conference on equine infectious diseases. Stresa Italy, 1966.

. GAINER (J. H.), ARSTIL (R. L.), BALL (H. T.), FILDS (L. J.) and NELSON (S. L.). 68th annual Proceedings United States Livestock Sanitary Association. 1965 p. 25

. GORET (P.), MICHEL (C.) et TOMA (B.). Gab. Méd. Vét., 1967, N-C.

. GORET (P.), MICHEL (C.) et TOMA (B.). 1 volume. Expansion Scientifique Française Paris, 1968, p. 1[illegible].

. GORET (P.) et coll. 1969, sous presse.

a. GRÄSBECK (R.), NOORMA (U. T.) et DE LA CHAPELLE (A.). Acta. med. Scand., suppl, 1964, 412, 39.

. GUARINI (G.). Bull. Off. Int. Epiz., 1966, 65, 1[illegible]

. HAYE (C.) et TARENTOLE (G.) Bull. Off. Int. Epiz., 1968, 69 5[illegible], 103.

. HALPERN (B.). Concours médical, 1969, 91, 1947.

. HALLAUER (C.) et MOSBRUGER (G. A.). [illegible] Arch. Tierheilk., 1960, 91, 73.

. HEDERMANN (W.). Thèse Vét., Hanovre, 1[illegible].

. HEMPEL (J.) Zeitschr. Infektionskr. Haustiere. 1909. 5, 381.

. HESS (W. R.) et DE TRAY (D. T.). Bact. Proc. Soc. Am., 1960, 8, 317.

. HOLT (L. J.), [illegible] (J. J.), Biochemistry, 196[illegible], 2, 959.

. HORNBECK (M.), [illegible] Arch. ges. virusforsch., 1967, 21, 98.

. ISHIZ (S.), Adv. Intl. Sci., 1963, 3, 2[illegible]

. ISHIZ (S.), TAKTORI (A.) [illegible] 1963, 32, 753.

. ISHIZ (S.), [illegible], Acta Health [illegible]

[illegible]ITANI (R.). Proceedings of the first international conference on Equine Infectious Diseases. Stresa, Italie, 1966, p. 1

KESTER (W. O.). J. Am. Vet. Med. Ass., 1955, [illegible], 1405.

[illegible], 1961, 11, 177.

[illegible], 1961, 11, 183.

[illegible], 1961, 11, 249.

[illegible], 1962, [illegible], 376.

[illegible] Nat. Inst. of Animal health quarterly, 1967, [illegible], 1.

[illegible], 1967, 7, 8.

[illegible], 1967, [illegible], [illegible].

[illegible], 1967, [illegible], 200

[illegible], 1964, [illegible], 71

[illegible] Nat. Inst. of Animal health quarterly, 1966, [illegible], [illegible].

[illegible] Nat. Inst. of animal health quarterly, 1966, [illegible], [illegible].

[illegible] Nat. Inst. of animal health quarterly, 1967, 7, [illegible]

[illegible], 1953, [illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible] C. R. Seane, [illegible]

[illegible]

[illegible]

MITCHELL (C. A.), HOMPEREYS (F. A.) et WALKER (R. V. L.). Can. J. Comp. Med. Vet. Sc [illegible]

[illegible]

[illegible] (K. [illegible]

[illegible] (W.) Proceedings of the first International Conference on Equine Infectious Diseases, Stresa, 1966, p. 42.

[illegible] et HUNGERFORD. Exptl. Cell. Res., 1960, 20, 613.

[illegible]. Communication personnelle.

[illegible] (F.). Mag. Far. Vet. Sc., 1923, 2, 197.

[illegible] (H.) et OBARA (J.). Nat. Inst. Anim. Hlth. Quart., 1964, 4, 129.

[illegible], TAKAKA (S.) et USHIMI (C.). Nat. Inst. Anim. Hlth. Quart., 1968, 8, 57

[illegible], TAKAKA (S.) et USHIMI (C.). Archiv. für die gesamte Virusforschung, 1969, 26, 295.

[illegible], TAKAKA (S.) et USHIMI (C.). Archiv. für die gesamte Virusforschung, 1969, 26, 380.

[illegible] (S.), USHIMI (C.) and OBARA (J.). Nat. Inst. Anim. Hlth. Quart., 1967, 7, 21.

[illegible] Schweiz. Arch. Tierheilk., 1960, 102, 462.

[illegible] (J. K.). Schweiz. Arch. Tierheilk. Inst. Aksp. Vet., 1959, 25, 139.

[illegible] (L.), [illegible] CHABASSOL (C.) et TOUSSOT (A.). Rev. Serv. biol. Vét. armées, 1967, 12, 35.

[illegible] et [illegible] (P. [illegible]). Revue vet., 1937, 14, 30.

[illegible] (P. [illegible]), [illegible] (C. C.), WITTMAN (J. W.) et [illegible] (A. [illegible]). [illegible], 1960, 11, 197.

[illegible] Proceedings of the first International Conference on Equine Infectious Diseases. Paris, 1960, p. 58.

[illegible] et TEIGLAND (M. B.). Proc. 5th. Ann. Meeting. Amer. Assoc. Equine Practitioners, [illegible].

[illegible] (W.), WADDELL (C. H.), FLYNN (J. H.) et TEIGLAND (M. B.). [illegible] Ann. [illegible], 140, [illegible].

[illegible] (C. E.) et GATES (D. W.). [illegible].

[illegible] (C. E.), GATES (D. W.) et ROGERS (H.). Vet. med., 1962, 57, 229.

[illegible] (S.). Hokkaido Project [illegible], 1959, [illegible].

[illegible] (I. S.), OBARA (J.) et KATADA (H.). [illegible]

[illegible] et WATASE (H.). Bull. Nat. Inst. Anim. Health, 1957, 33, [illegible].

[illegible]. TANAKA (K.) et HIRASAWA (K.). Nat. Inst. Anim. Hlth. Quart., 1962, 2, 82.

[illegible] (K.) MORIMOTO (T.) et WATANABE (M.). Nat. Inst. Anim. Hlth. Quart., 1962, 2, 189

[illegible]. TOMA (B.). Rec. Méd. Vét., 1966, 142, 1127.

96. [illegible] PETRIK [illegible], FRIES (D.), CARRAZ (M.), SAUBIER (E.), BONNET (P.), ARCHIMBAUD [illegible], BERNHARDT [illegible], BROCHEER (J.), BETUEL (H.), VEYSSERE (C.), [illegible] et PRIEST (J.). Presse médicale, 1968, 76, 1561.

[illegible]. [illegible] Res., 1963, 24, 381.

[illegible]. [illegible] Sc., 1904, [illegible], 331

[illegible] (H.) et [illegible] (H.). C. R. Ac. Sc., 1904, 139, 531.

[illegible]. WATANABE (S.). [illegible] Vet. Sci., 1960, 22, [illegible].

[illegible]. WATANABE (S.). [illegible] Vet. Sci., 1960, 22, 79.

[illegible]. WATANABE (S.). [illegible] Vet. Sci., 1960, 22, 190.

[illegible]. WATANABE [illegible] Vet. Sci., 1966, 28, 73.

[illegible] Vet. Sci., 1966, 28, 119.

[illegible] (K.) Nature, 1967, 215, 591.

[illegible] 1968, [illegible], 157.

[illegible]

[illegible] Res. [illegible] Infectiosas Anemia Rodrig., 1968, [illegible]

[illegible] 1968, 139, [illegible]

TABLE DES MATIERES

Pages

Introduction ..... 1

Première partie : Connaissances acquises en matière de culture de leucocytes. Applications à l'étude du virus de l'Anémie infectieuse des équidés..... 8

I. Connaissances acquises en matière de culture de leucocytes..... 9

A. Les cultures de leucocytes humains et de diverses espèces animales..... 9

1. Culture de leucocytes humains..... 9

a) Technique classique..... 9

b) Stimulation par la phytohémagglutinine (PHA). 11

c) Stimulation par sérum antilymphocytaire..... 12

d) Test de transformation lymphoblastique..... 13

2. Culture de leucocytes de porc..... 14

Technique de HESS et DE TRAY..... 14

Technique de HAAG et LARENAUDIE..... 14

3. Culture de leucocytes bovins..... 17

Technique de TOKUDA et coll..... 17

Technique de KONO..... 17

4. Culture de leucocytes de poulet..... 18

B. Etude particulière de la culture des leucocytes de cheval. 19

1. Modalités de mise en culture..... 19

a) Technique de KOBAYASHI..... 19

b) Technique de WATANABE..... 19

c) Technique de LIVINGSTON et coll..... 20

d) Technique de DESCARPENTRIES..... 20

2. Milieux de culture utilisés..... 20

3. Concentration des leucocytes..... 21

4. Chevaux donneurs de leucocytes..... 22

Pages

II. Connaissances acquises sur le virus de l'anémie infectieuse des équidés ..... 23

A. Propriétés physiques et action des agents physiques ..... 23

1. Filtration ..... 23
2. Ultracentrifugation ..... 23
3. Adsorption ..... 24
4. Action de la température ..... 24
5. Action des rayons ..... 25

B. Morphologie ..... 25

C. Propriétés chimiques et action des agents chimiques ..... 26

D. Culture du virus ..... 27

1. Culture in vivo ..... 27
2. Culture in ovo ..... 27
3. Culture en culture cellulaire ..... 28

a) Effet cytopathogène ..... 29
b) Passages en série ..... 30
c) Vérification de la replication virale en culture de leucocytes de cheval par inoculation au cheval ..... 31
d) Titrage du virus ..... 31
e) Interférence avec d'autres virus ..... 32

E. Virulence ..... 33

F. Pouvoir antigène ..... 33

G. Pouvoir immunigène ..... 34

H. Pouvoir allergène ..... 35

Pages

Deuxième partie : Recherches personnelles..... 36

Introduction : But du travail et ensemble des recherches entreprises. 37

I. Détermination des conditions optimales de culture des leucocytes de cheval. ..... 38

Introduction..... 37

A. Matériel et techniques..... 39

1. Matériel..... 39

2. Techniques..... 39

a) Mise en culture..... 39

b) Milieux utilisés..... 43

c) Concentration leucocytaire..... 44

d) Influence du pH..... 45

e) Stimulation des leucocytes par la phytohémagglutinine et le sérum antilymphocytaire..... 45

f) Essai de trypsination des leucocytes..... 47

g) Culture de leucocytes de cheval au cours d'une crise d'Anémie infectieuse..... 48

h) Appréciation de l'état des leucocytes..... 48

B. Résultats..... 50

a) Mise en culture..... 50

b) Milieux utilisés..... 52

c) Concentration leucocytaire..... 54

d) Influence du pH..... 54

e) Influence du cheval donneur de cellules..... 54

f) Stimulation des leucocytes de cheval en culture par la phytohémagglutinine et le sérum antilymphocytaire..... 55

g) Trypsination des leucocytes..... 57

h) Culture des leucocytes d'un cheval au cours d'une crise d'Anémie infectieuse..... 57

i) Culture à 30°..... 57

C. Discussion..... 58

Pages

II. Etude du virus de l'anémie infectieuse inoculé aux cultures de leucocytes de cheval ..... 61

A. Matériel ..... 62

1. Souches virales ..... 62
2. Systèmes cellulaires ..... 62
3. Milieux de culture ..... 63
4. Produits de laboratoire ..... 63
5. Chevaux ..... 63
6. Microscope électronique ..... 64

B. Techniques ..... 65

1. Inoculation des cultures de leucocytes ..... 65
2. Emploi d'autres systèmes cellulaires ..... 65

a) Cellules $PK_{15}$ ..... 66
b) Cellules KB ..... 66
c) Cellules rénales de singe ..... 67
d) Cellules NIL ..... 67

3. Titrage du virus en culture de leucocytes ..... 68
4. Culture de leucocytes sous couche de gélose ..... 68
5. Filtration ..... 69
6. Emploi de la 5 iodo 2 desoxyuridine ..... 69
7. Emploi de l'acridine orange ..... 70
8. Microscopie électronique ..... 71

C. Résultats ..... 73

1. Rapports antigéniques et immunogéniques entre les souches françaises et américaine du virus de l'anémie infectieuse ..... 73
2. Effet cytopathogène sur les leucocytes de cheval ..... 73

a) Cellules vivantes ..... 73
b) Après coloration ..... 77

3. Passages en série sur leucocytes de cheval ..... 80

Pages

4. Autres systèmes cellulaires ..... 83

5. Titrage du virus sur leucocytes de cheval. 83

6. Culture des leucocytes sous couche de gélose. 83

7. Filtration..... 86

8. Nature de l'acide nucléique..... 86

a) Action de la 5 iodo 2 desoxyuridine..... 86

b) Emploi de l'acridine orange..... 88

9) Etude au microscope électronique..... 91

D. Discussion..... 95

1) Effet cytopathogène sur les leucocytes de cheval..... 95

a) Cellules vivantes..... 95

b) Après coloration..... 95

2. Passages en série sur leucocytes de cheval. 98

3. Autres systèmes cellulaires..... 98

4. Titrage du virus sur leucocytes de cheval.. 99

5. Culture des leucocytes sur couche de gélose. 100

6. Filtration..... 100

7. Nature de l'acide nucléique..... 100

a) Action de la 5 iodo 2 desoxyuridine..... 100

b) Emploi de l'acridine orange.....

8. Pouvoir immunigène du virus de l'anémie infectieuse ..... 101

9. Microscope électronique..... 102

Conclusion..... 105

Bibliographie..... 106

# DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté

Le virus de l'encéphalomyélite animale du Proche - Orient

Ses rapports avec le virus de la maladie de Borna.

Vu et approuvé

Paris, le 30 Juin 1969

Le Doyen de la Faculté des Sciences de Paris

M. ZAMANSKI

'imprimer

adémie de Paris

CHE

Sc.3e 62.05 (6)